

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO DO PERFIL DE ACETILAÇÃO LENTA DO
GENE *NAT2* NA SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER, NA
REGIÃO NORTE DO BRASIL.**

Marianne Rodrigues Fernandes

BELÉM-PA
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO DO PERFIL DE ACETILAÇÃO LENTA DO
GENE *NAT2* NA SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER, NA
REGIÃO NORTE DO BRASIL.**

Autora: Marianne Rodrigues Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Rommel Rodriguez Burbano

Orientador: Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM-PA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB/UFPA)

Fernandes, Marianne Rodrigues, 1988-

Associação do perfil de acetilação lenta do gene NAT2 na susceptibilidade ao câncer, na região norte do Brasil / Marianne Rodrigues Fernandes; Orientador, Prof. Dr. Rommel Rodriguez Burbano; Co-orientador, Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos. — 2013.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2013.

1. Neoplasias. 2. Genes Neoplásicos. 3. Neoplasias da Mama. 4. Neoplasias Gástricas. I. Título.

CDD - 23. ed. 616.99409811

Aos meus pais Lindalva e Oberdan que tanto amo, dedico esta realização e agradeço pela vida, apoio e incentivo para que eu pudesse alcançar os meus sonhos.

As minhas irmãs Lilianne e Christianne e sobrinho Giovanni, pelo carinho e todos os momentos de alegria e força, que com toda certeza, foram essenciais para que eu obtivesse essa conquista.

Aos meus amigos e amigas-irmãs Jaquelines, pela grande amizade que tornou esta caminhada menos difícil

Ao Ney que muito se dedicou nestes anos e foi um grande companheiro...

AGRADECIMENTOS

Para a realização da minha dissertação, contei com o apoio de várias pessoas e instituições, que colaboraram de várias maneiras para a realização deste trabalho. Gostaria de agradecer...

Ao Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA, no qual foi desenvolvido grande parte deste projeto, agradeço pelo acolhimento e apoio na realização dos experimentos.

Ao Núcleo de Pesquisas em Oncologia da UFPA, que me acolheu como filha, além se ser um sonho para todos nós que fazemos dele parte, tomo como compromisso também fazer-lhe sempre forte e contribuir para que cresça com muito sucesso.

Aos Hospitais: Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) e Ophir Loyola, que permitiram a coleta das amostras e o atendimento aos pacientes oncológicos. A Universidade Federal do Pará, Fapespa, e CAPES pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho.

A todos os pacientes que consentiram a utilização do seu DNA para realização do estudo.

Um agradecimento muito especial ao Dr. Paulo Assumpção pelo apoio e liderança e a Dra. Samia Demachki pela amizade e carinho, que me fizeram crescer muito como profissional nestes anos e serviram de exemplo para a minha vida acadêmica.

Aos, Dr. Sidney Santos e Dra. Ândrea Ribeiro dos Santos, que além do incentivo e apoio na vida acadêmica, também sempre me acolheram carinhosamente como membro de sua família.

Ao Dr. Rommel Burbano, pela orientação nestes anos de projeto.

Aos meus colegas de turma na Pós-Graduação de Oncologia: Alayde, Clarissa e Christiano pela companhia tão agradável, momentos de descontração ao longo das disciplinas e permitir que eu visse a Oncologia através dos olhos de outras áreas profissionais.

A Darlen, por ser um exemplo de aluna e profissional. Muito obrigada por ter me ensinado muito na rotina do laboratório de pesquisa, contribuído com o desenvolvimento do meu trabalho inquestionavelmente e além de tudo, sempre me emprestar seus ouvidos e conselhos nos momentos de conflito.

As minhas tão queridas “filhas” do laboratório: Amanda, Darlen, Ellen, Gabriela, Giovanna, Karla, Juliana, Lídia, Luciana e Paula; e ao cunhado-amigo André, por tornarem o ambiente de estudo e trabalho muito especial e prazeroso de se viver. Saber que cada etapa da vida e conquista de cada um de nós, será comemorada com sinceridade é um grande presente pra mim!

Aos colegas do Núcleo: Aline Cruz pelo apoio, conselhos e amizade muito importantes nesta caminhada; Renato por estar sempre pronto para “quebrar” todos os galhos que surgiram ao final deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana e Médica: Igor, Tarcísio, Roberta, Natalle, Paulo (com saudades), Rafael, Carol, Dayse, Danilo, Mara, Diego, Celso, Elzemar, Kleber e Teca.

E todas as outras pessoas do LGHM e NPO que de alguma maneira contribuíram para a realização deste projeto.

As amigas biomédicas, Alice, Natalie, Liéle e Raquel, que ao longo destes anos de vida acadêmica sempre torceram por mim e compartilharam bons momentos.

Aos meus pais por todo o amor, exemplo de vida e dedicação que tiveram para a minha criação. As minhas irmãs Lilianne e Christianne; Ricardo e Giovanni que sempre estiveram do meu lado me enchendo de incentivo e força para continuar em busca dos meus objetivos. A tia Helena, pelos cuidados ao longo da minha vida.

As minhas amigas-irmãs: Jaqueline Rodrigues e Jaqueline Marques, que sempre torceram por mim, e me estenderam a mão nestes tantos anos de amizade e de vida profissional.

Ao Ney, que sempre esteve ao meu lado torcendo e dando apoio em minhas conquistas. Pela paciência e pela perda dela, muitas vezes, pela confiança e carinho todos os dias intensos que vivemos.

A toda a família Rodrigues-Fernandes que sempre torceu e acreditou em mim; as famílias Pereira-Carneiro, Santos e a Dona Therezinha que me proporcionaram muitos momentos especiais nestes anos.

A todos os meus amigos: Diego (Dudu), Cilene, Samira, Thiago, Rui, Raphael, Paulo, Carlos Eduardo, Sylvia (professora e amiga querida), Cynthia e Thiago que sempre me proporcionaram momentos maravilhosos acreditando e me incentivando a crescer.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

As pesquisas realizadas no laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas e no Núcleo de Pesquisas em Oncologia, ambos da Universidade Federal do Pará foram subvencionadas pela Fundação Amazônia Paraense do estado do Pará (FAPESPA).

O presente projeto foi financiado no âmbito do Projeto pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em saúde – PPSUS Edital 13/2009: Desenvolvimento de um painel de marcadores genéticos associados à susceptibilidade e farmacogenética do câncer gástrico no estado do Pará.

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

*“A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ver com novos olhos.”*

Marcel Proust

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Marcadores do câncer com capacidades diferenciadas e complementares que permitem o crescimento tumoral e disseminação metastática; e as características emergentes que fornecem base sólida para a compreensão da biologia do Câncer. 17
- Figura 2.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, na região Norte do Brasil, exceto pele não melanoma*. 20
- Figura 3.** Representação da estrutura do gene *NAT2* e seus principais polimorfismos. 33
- Figura 4.** Distribuição de frequências de haplótipos do gene *NAT2* em amostras de 99 populações incluídas na pesquisa de diversidade mundial. 36

TABELAS

- Tabela 1.** Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, no Brasil, segundo sexo e localização primária*. 19

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

ACS	American Cancer society
CI	Intervalo de confiança
CYP	Citocromo P450
DP	Desvio padrão
D'	Desequilíbrio de ligação
GST	Glutathione-S-Transferase
IAM	Informative ancestry marker (Marcador informativo de ancestralidade)
IARC	Agência internacional para pesquisa em câncer
INCA	Instituto nacional do câncer
INDEL	Sistemas bialélicos de inserção e deleção
MS	Ministério da Saúde
NAT	N-acetiltransferase
NCI	National câncer institute
OR	Odds ratio (Taxa de risco)
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de base única)
TSG	Gene supressor tumoral
WHO	World Health organization (Organização Mundial de Saúde)
χ^2	qui-quadrado
Δ	Delta

RESUMO

ASSOCIAÇÃO DO PERFIL DE ACETILAÇÃO LENTA DO GENE *NAT2* NA SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER, NA REGIÃO NORTE DO BRASIL.

Objetivos: O gene N-acetiltransferase 2 (*NAT2*) é um marcador para o estudo da susceptibilidade interindividual ao desenvolvimento de neoplasias malignas, visto que a enzima *NAT2* participa da metabolização de agentes carcinogênicos e os polimorfismos de base única (SNP) do seu gene produzem enzimas com diferentes atividades, levando a acetilação lenta ou rápida de xenobióticos. O objetivo do presente estudo foi verificar uma possível associação entre os SNPs do gene *NAT2* e a susceptibilidade ao acometimento de Adenocarcinoma gástrico ou Carcinoma ductal invasivo da mama em pacientes da região norte do Brasil. **Material e Métodos:** Os cinco polimorfismos de grande importância para a determinação do perfil de metabolização da enzima *NAT2* (C282T, T341C, C481T, A803G e G857A) foram investigados por sequenciamento direto de 986 pares de bases, amplificados em duas reações de PCR, no total de 133 pacientes com câncer (63 com Câncer Gástrico e 70 com Câncer de Mama) e 89 indivíduos Controles. Para evitar interpretações espúrias decorrentes do subestruturamento populacional, empregamos um painel de 48 marcadores informativos de ancestralidade (IAM). **Resultados:** Encontramos diferenças estatísticas para a contribuição parental Africana e Européia, quando comparadas entre os grupos com Câncer e Controles, uma contribuição maior do grupo Africano foi detectada no grupo de estudo com câncer e, no grupo controle, foi detectada uma maior contribuição do grupo Europeu ($p < 0,001$). Os genótipos do polimorfismo C282T dominante (TT + CT) apresentaram associação significativa ($p < 0,001$; OR 3,076; CI 95% 1,664-5,687) para a susceptibilidade as diferentes formas de Câncer investigadas. Foi observada uma associação significativa do perfil de acetilação lenta e rápida com a susceptibilidade ao desenvolvimento das neoplasias investigadas ($p = 0,010$; OR 3,054; CI 95% 1,303–7,159) e ($p = 0,041$; OR 0,527 CI 95% 0,280-0,973) evidenciando que indivíduos com o perfil acetilador lento apresentaram um risco aumentado em até três vezes no desenvolvimento de neoplasias quando comparado com os indivíduos controles. **Conclusão:** O controle genômico da ancestralidade foi efetivamente importante para a presente investigação possibilitando controlar o efeito da ancestralidade na associação do gene *NAT2* para susceptibilidade ao câncer. Neste trabalho foi possível evidenciar a forte influência do perfil de acetilação lenta do gene *NAT2* de xenobióticos na susceptibilidade ao Câncer Gástrico e de Mama.

Palavras-chave: *NAT2*; Susceptibilidade; SNP; AIM.

ABSTRACT

THE ACETYLATION PROFILE ASSOCIATION OF NAT2 GENE TO CANCER SUSCEPTIBILITY, IN NORTHERN BRAZIL.

Objectives: The *N-acetyltransferase 2 (NAT2)* gene is a marker for the study of interindividual susceptibility to develop malignant neoplasms, once the enzyme NAT2 takes part in the metabolism of carcinogenic agents and the single nucleotide polymorphism (SNP) of its gene produces enzymes with different activities, leading to either slow or fast acetylation of xenobiotics. The purpose of this study was to investigate a possible association between the *NAT2* gene SNPs and susceptibility to the involvement of gastric adenocarcinoma or invasive ductal carcinoma of the breast in patients of northern Brazil. **Methods:** Five polymorphisms of great importance for defining the metabolism profile of enzyme NAT2 (C282T, T341C, C481T, A803G and G857A) were investigated by direct sequencing of 986 base pairs, amplified in two PCR reactions, totalizing 133 patients with neoplasms (63 with Gastric Cancer-GC and 70 with Breast Cancer-BC) and 89 Control subjects. In order to avoid spurious interpretations resulting from the population substructure, we used a panel with 48 ancestry informative markers (AIM). **Results:** We found statistical differences for African and European parental contribution when compared between the Cancer and Control groups; a higher African contribution was detected in the study group with Cancer and, in the control group, it was detected a higher European contribution ($p < 0.001$). Dominating polymorph genotypes C282T (TT + CT) showed significant association ($p < 0.001$; OR 3.076; CI 95% 1.664-5.687) for susceptibility to the different forms of Cancer investigated. A significant association of slow and fast acetylation profile with the susceptibility to develop the investigated neoplasms was noticed ($p = 0.010$; OR 3.054; CI 95% 1.303–7.159) and ($p = 0.041$; OR 0.527 CI 95% 0.280-0.973) clearly showing that individuals with slow acetylator profile showed a risk of developing neoplasms increased to up to three times when compared to Control subjects. **Conclusions:** Ancestry genomic control was effectively important for this investigation and enabled the control of the ancestry effect on the association of *NAT2* gene for susceptibility to cancer. In this study, it was possible to prove the strong influence of xenobiotics slow acetylation profile on the susceptibility to GC and BC.

Keywords: *NAT2*, Susceptibility, SNP, AIM

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

Capítulo I. INTRODUÇÃO	14
I.1 Considerações gerais	15
I.2 Epidemiologia do câncer	18
I.3 Câncer gástrico	20
I.4 Câncer de mama.....	23
I.5 Marcadores moleculares de susceptibilidade ao câncer.....	26
I.6 Genes de susceptibilidade ao câncer.....	27
I.6.1 ONCOGENES.....	28
I.6.2 GENES SUPRESSORES TUMORAIS.....	29
I.6.3. GENES MODIFICADORES DE RISCO.....	31
I.6.3.1 O gene <i>NAT2</i>	33
I.6.3.2 Diversidade genética do gene <i>NAT2</i>	35
I.6.3.3 O gene <i>NAT2</i> e a susceptibilidade ao câncer	38
I.7 Controle genômico de ancestralidade em investigações do tipo caso-controle	39
I.8 Aplicabilidade do estudo na prática clínica	43
Capítulo II. OBJETIVOS	46
II.1 Objetivo geral.....	47
II.2 Objetivos específicos	47
Capítulo III. ASSOCIATION OF SLOW ACETYLATION PROFILE OF <i>NAT2</i> WITH BREAST AND GASTRIC CANCER RISK IN BRAZIL	48
Capítulo IV. DISCUSSÃO GERAL	56

IV.1 Estimativa de mistura interétnica em pacientes com câncer e controles..	57
IV.2 Frequência dos SNPs do gene <i>NAT2</i> associados com a susceptibilidade ao câncer	59
IV.3 Genótipos do gene <i>NAT2</i> associados com a susceptibilidade ao câncer..	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA	73
1. Termo de aprovação do Comitê de ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto-HUJBB.	73
2. Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.	74

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

I.1 Considerações gerais

Neoplasia (grego para "novo crescimento") é um termo usado para definir a proliferação anormal e descontrolada de células em um tecido ou órgão. A maioria dos tipos de neoplasias malignas possui um grande grau de anaplasia e são capazes de formar massas (tumores malignos), que frequentemente possuem propriedades de invasão de estruturas vizinhas (WHO, 2009). As células neoplásicas possuem ainda a capacidade de se espalhar por meio do sistema linfático e corrente sanguínea, para outros órgãos e formar novos tumores (metástase).

O câncer é um sinônimo de neoplasia maligna, e consiste em um conjunto de doenças, caracterizadas pela proliferação desordenada de células anormais (WHO, 2009; ACS, 2012; NCI, 2012).

O câncer consiste em uma doença complexa e multifatorial, nas quais as causas externas referem-se à influência do meio ambiente, hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. Enquanto as causas internas, na maioria das vezes são geneticamente determinadas com alterações em genes (oncogenes), na imunidade, estado hormonal, capacidade de reparo do DNA e a capacidade de eliminação de compostos carcinogênicos e mutagênicos (INCA/MS, 2011).

Dentre os inúmeros fatores que favorecem o risco para o desenvolvimento do câncer, estão: o envelhecimento; tabagismo; consumo de álcool; radiação solar; radiação ionizante; substâncias químicas; hormônios; alguns vírus e bactérias; histórico familiar; dieta; ausência de atividades físicas; e sobrepeso (NCI, 2012).

A carcinogênese consiste em uma via etiológica subjacente que conduz ao câncer. Existem alguns modelos considerados de maior relevância para a carcinogênese, dois deles são os principais. O modelo de Vogelstein e Kinzler (2004) defende que o câncer consiste em uma doença que promove danos ao DNA, caracterizada pelo acontecimento de várias mutações genéticas que podem transformar células normais em células cancerosas, através da inativação de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes, resultando em desordens que levam ao câncer.

Indivíduos com uma predisposição hereditária ao câncer (câncer hereditário), devido a presença de mutações germinativas localizadas em genes envolvidos no desenvolvimento do câncer, são considerados indivíduos com risco aumentado para a ocorrência de neoplasias. Por outro lado, as mutações germinativas não

acontecem, e não existe a predisposição hereditária, neste caso, as neoplasias podem ser originados pela interação de uma mutação somática (surge ao longo da vida) e a contribuição da exposição ao meio ambiente (câncer esporádico); (Vogelstein and Kinzler, 2004).

O modelo de Hanahan e Weinberg (2000) aborda os acontecimentos marcantes ao nível celular, que levam a formação de um tumor maligno. Neste modelo, as características do câncer incluem a indução de angiogênese permanente, potencial replicativo ilimitado, a fuga da apoptose, a auto-suficiência em sinais de crescimento e silenciamento dos sinais de anticrescimento, levando às características definidoras de tumores malignos, dando-lhes a capacidade de invadir tecidos vizinhos e causar metástase. Este modelo do processo carcinogênico, mais recentemente acrescentou dois marcadores emergentes: a reprogramação do metabolismo energético celular e o escape da destruição pelo sistema Imune das células (Hanahan and Weinberg, 2011).

Na Figura 1, são expostos os oito marcadores distintos e complementares do câncer que permitem o crescimento tumoral e metastático. Estes marcadores proporcionam uma base sólida para à compreensão da biologia do câncer, em conjunto com as duas características emergentes: a instabilidade genômica (com poder de mutabilidade das células cancerosas) com alterações genéticas que levam a progressão do tumor; e a ação de células imunes que normalmente agem na Inflamação destinadas a combater infecções e cicatrizar lesões e em alguns casos podem resultar em indução de tumores como conseqüências de respostas inflamatórias (Hanahan and Weinberg, 2011).



Figura 1. Marcadores do câncer com capacidades diferenciadas e complementares que permitem o crescimento tumoral e a disseminação metastática; e as características emergentes que fornecem uma base sólida para a compreensão da biologia do câncer. Modificado de Hanahan and Weinberg, 2011.

Este modelo destaca a teoria do campo organizacional tecidual, a qual defende que a carcinogênese é mais atuante ao nível dos tecidos em vez de células. Esta teoria baseia-se na premissa de que a carcinogênese é impulsionada por defeitos na organização dos tecidos, e que todas as células estão inerentemente em estado proliferativo. Em adicional às células cancerosas, segundo esta nova formulação no conceito da carcinogênese, os tumores apresentam uma nova dimensão de complexidade contendo um repertório de recrutadores, ostensivamente as células normais que contribuem para a aquisição de características marcantes, criando o “microambiente tumoral” (Hanahan and Weinberg, 2011).

Modelos da carcinogênese, tais como os descritos se apresentam de forma simples, mas, no entanto, mostram que o mecanismo da carcinogênese requer uma gama complexa de etapas que ocorrem frequentemente durante décadas (Hanahan and Weinberg, 2011).

A complexidade da carcinogênese é ampliada quando se considera que os acontecimentos específicos da via descritos por estes modelos, seriam características únicas para cada local anatômico. Porém, os fatores de risco e

características clínicas de doenças malignas apresentam variação considerável por localização anatômica e ainda por diferentes tipos de tumor no mesmo local anatômico. Por estas razões, o câncer humano é uma família de doenças muito complexas (NCI, 2012).

I.2 Epidemiologia do câncer

Nas últimas décadas, o câncer, vem se convertendo em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial de Saúde estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes e um total de 75 milhões de pessoas com câncer (WHO, 2009). O maior efeito desse aumento irá incidir em países de baixa e média renda (INCA/MS, 2011).

A estimativa mundial mais recente para o ano de 2008, previa a incidência de 12,4 milhões de casos de câncer em todo o mundo e 7,6 milhões de mortes causadas por neoplasias. O tipo de câncer mais incidente e a maior causa de mortalidade relacionada ao câncer, em todo o mundo, foi o câncer de pulmão nos homens, enquanto nas mulheres foi o câncer de mama (WHO, 2009). Os cânceres mais comuns no mundo, em termos de incidência foram: pulmão, mama e colorretal. As estimativas de mortalidade foram lideradas pelo câncer de pulmão, seguido pelo câncer de estômago e câncer de fígado (WHO, 2009).

As altas taxas de mortalidade refletem a fatalidade dos diferentes tipos de câncer. Em homens, o câncer de pulmão continua a ser a causa mais comum de morte. Os cânceres de Pulmão, Mama e Colorretal representam 42,5% do total de óbitos em mulheres nos países mais desenvolvidos, enquanto o Câncer do Colo uterino ocupa o primeiro lugar em países menos desenvolvidos (13,9% do total), seguido por câncer de mama (12,7%) e câncer de estômago (9,6%); (WHO, 2009).

No Brasil, as estimativas de câncer para o ano de 2012, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem a inclusão dos casos de câncer de pele não melanoma, que são os casos mais incidentes na população em geral, são indicados 385 mil casos novos de outros canceres (INCA/MS, 2011). Na população brasileira, os cânceres mais incidentes serão: próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (tabela 1). Quando estratificados pela incidência por sexo, as estimativas apontam que os casos mais incidentes para o sexo masculino serão: próstata, pulmão, cólon

e reto e estômago; e para o sexo feminino: câncer de mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide.

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer no Brasil, segundo sexo e localização primária*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Colo e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	195.190	202,85	51.780	248,60	189.150	188,58	59.280	254,86
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
Todas as Neoplasias	257.870	267,99	66.400	318,79	260.640	259,86	75.180	323,22

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.
Modificado de INCA/MS, 2011.

A região Norte do Brasil, segundo as estimativas do INCA para o ano de 2012, seria responsável por 15.290 casos novos de câncer sem a contagem dos casos de neoplasia de pele não melanoma. Deste total, o gênero masculino seria responsável por cerca de 7.450 casos e o gênero feminino por 7.840 casos. A figura 2 evidencia de acordo com o gênero, a distribuição de diferentes formas de câncer na região Norte do Brasil. No gênero masculino, as formas mais freqüentes de câncer seriam o de próstata, estômago, pulmão e colon e reto. Para o gênero feminino os tipos mais freqüentes seriam o câncer de colo uterino, seguido pelos casos de câncer de mama e glândula tireóide e estômago (INCA/MS, 2011).


Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	2.390	32,1%		Homens	Mulheres	1.860	23,7%
Estômago	850	11,4%			Colo do Útero	1.530	19,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	630	8,5%			Mama Feminina	580	7,4%
Colon e Reto	310	4,2%			Glândula Tireoide	450	5,7%
Leucemias	280	3,8%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	400	5,1%
Cavidade Oral	250	3,4%			Colon e Reto	380	4,8%
Laringe	210	2,8%			Leucemias	220	2,8%
Linfoma não Hodgkin	170	2,3%			Ovário	200	2,6%
Sistema Nervoso Central	160	2,1%			Cavidade Oral	140	1,8%
Bexiga	150	2,0%			Sistema Nervoso Central	130	1,7%

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, na região Norte do Brasil, exceto pele não melanoma*.

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Modificado de INCA/MS, 2011.

No estado do Pará, a realidade da incidência do câncer segue o mesmo padrão do resto país, sendo responsável pelo total de 6.630 casos novos no ano de 2012. O gênero masculino é representado por 3.080 casos e o feminino por 3.550 casos, sem a inclusão do câncer de pele não melanoma. Os tipos de casos de neoplasias mais incidentes em todo o estado seriam Próstata, Colo do útero, Mama feminina e Estômago. Para o gênero masculino, as estimativas do estado concordam com as da capital, a cidade de Belém, as quais previam o Câncer de Próstata como o mais incidente, seguido pelos casos de Estômago e Traquéia, Brônquio e Pulmão. Para o gênero feminino, as estimativas para o estado do Pará revelaram como os tipos mais incidentes o Câncer de Colo do útero, Mama e Estômago, enquanto na capital do estado, observou-se que o Câncer de Mama seria o mais incidente, seguido pelo Colo do útero, Glândula Tireóide e Estômago (INCA/MS, 2011).

I.3 Câncer gástrico

A etiologia do câncer gástrico é esporádico e multifatorial, atribuída a eventos genéticos, epigenéticos, ambientais e hábitos alimentares (Forone *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2006; Resza *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2008; Ferrasi *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2010; Leal *et al.*, 2012a).

Histologicamente, o adenocarcinoma é responsável por 95% da tumorigênese gástrica, os 5% restante compreendem aos: sarcomas, leiomiiossarcomas, carcinóides de células escamosas, tumores estromais, GIST (tumor estromal gastrointestinal) e linfomas (INCA, 2012; Forone *et al.*, 2005). O

adenocarcinoma gástrico é o tipo histológico mais comum, restrito à mucosa ou à submucosa, localizado mais frequentemente na região do antro, seguido das regiões do corpo, fundo e cárdia (Forone *et al.*, 2005), este tipo foi agrupado em intestinal e difuso, segundo as diretrizes histológicas da classificação de Lauren (1965). A etiologia e a evolução da doença podem variar entre populações, localização do tumor primário, subtipos histológicos e outras variáveis (Leal *et al.*, 2012a).

Em geral, o câncer gástrico apresenta os fatores de risco ambientais e comportamentais como os principais para o seu desenvolvimento (WHO, 2009). Entretanto vários fatores genéticos podem influenciar na carcinogênese gástrica. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, indivíduos do grupo sanguíneo A possui maior frequência para o desenvolvimento do câncer gástrico, aproximadamente 20%, quando comparados aos indivíduos de outros grupos sanguíneos (WHO, 2009).

Na atualidade, estudos têm explorado a biologia molecular para responder questões ligadas a patogenicidade do câncer gástrico (Scartozzi *et al.*, 2009). Alguns estudos relacionam genes candidatos que podem modular a resposta do hospedeiro à infecção com *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) - (WHO, 2009), outros identificam vários marcadores moleculares exercendo papel de prognósticos ou indicadores preditivos para estratégias terapêuticas apropriadas (Scartozzi *et al.*, 2009).

Análises genéticas no Câncer gástrico sugerem que ocorrem principalmente alterações estruturais e funcionais de vários oncogenes e genes supressores de tumores, assim como a instabilidade genética (Assumpção and Burbano, 2005). Diversos genes e proteínas têm sido propostas como biomarcadores na carcinogênese gástrica, alterações dos oncogenes: *MYC* (Lima *et al.*, 2008), *HRAS* (Oh, 2010; Kwack *et al.*, 2010) e *CTNNB1* (Wang *et al.*, 2012), bem como dos supressores de tumor: *TP53* (Alves *et al.*, 2010), *APC* (Ferrasi *et al.*, 2010) e *CDH1* (Guilford *et al.*, 1998) foram relatados. Embora a desregulamentação destes genes e proteínas tenha sido intensamente estudada na neoplasia Gástrica, um perfil mais completo ainda é necessário para compreender o processo de carcinogênese (Leal *et al.*, 2012b).

A identificação de características genéticas peculiares dos tumores gástricos podem ajudar a prever o prognóstico de pacientes com a neoplasia e permitir abordagens terapêuticas mais precisas (Calcagno *et al.*, 2008).

A carcinogênese gástrica é um processo a longo prazo, são necessários

vários anos com início no tecido normal, para fases intermediárias de gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia e por fim no câncer. Estas lesões precursoras podem ser assintomáticas, e diagnosticadas através da realização de biópsias gástricas. Estudos observacionais e ensaios clínicos randomizados também estudaram essas lesões precursoras em relação aos fatores de risco para o câncer gástrico (WHO, 2009).

Estratégias para prevenção do câncer de estômago incluem melhorias no saneamento básico e mudanças no estilo de vida da população (WHO, 2009). Em relação ao estilo de vida, muitos fatores podem ser controlados para reduzir os riscos envolvidos na susceptibilidade à neoplasia gástrica.

O aumento do uso de refrigeradores promove melhor conservação dos alimentos (que anteriormente era realizada com utilização do sal) aliado a modificações com inclusão de hábitos alimentares mais saudáveis da população (aumento da ingestão de frutas, legumes e verduras frescas) podem ser fatores benéficos na redução de riscos associados a exposição (WHO, 2009).

Alimentos mal conservados que compartilham altas concentrações de nitratos/nitritos, denominadas N-compostos, podem ser altamente carcinogênicos após a biotransformação (Resende *et. al.*, 2006). A hipótese de que a alimentação saudável possa ser um fator protetor ao risco para este câncer deve-se ao fato de que as frutas e legumes frescos possuem vitaminas (C e E) e o betacaroteno, com propriedades antioxidantes que funcionam como protetores naturais contra o processo de formação da nitrosamina (Resende *et. al.*, 2006; WHO, 2009).

Outros fatores não dietéticos que devem ser considerados de risco são etnia, tabagismo e o etilismo (Globocan, 2008). Um fator que também deve ser controlado é a redução na prevalência de infecção pela *H. pylori*, considerado um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento do câncer do estômago (Globocan, 2008; WHO, 2009). A prevalência mundial de infecção pelo *H. pylori* é de 50%, sendo que chega a 90% nos países em desenvolvimento (WHO, 2009).

O câncer do estômago é um tipo de tumor que não possui um bom prognóstico, sendo a razão da mortalidade/incidência considerada alta em todas as partes do mundo (INCA, 2012). Até o momento, a cirurgia é a terapia padrão para se obter a cura. No entanto, a quimioterapia vem sendo uma alternativa valiosa, com o objetivo de aumentar a sobrevida do paciente (Nishiyama and Eguchi, 2008).

De acordo com a estimativa mundial mais recente, o câncer gástrico é a quarta causa mais comum de neoplasias, com 934.000 casos novos por ano. A taxa de incidência é cerca de duas vezes mais alta de casos no sexo masculino (467.000 casos) do que no feminino (246.000). Mais de 70% do total de casos ocorrem em países em desenvolvimento. A sobrevivência para o câncer gástrico é baixa, pois os pacientes são frequentemente diagnosticados em estágio avançado ocupando o segundo lugar em mortalidade por câncer em todo o mundo (WHO, 2009).

No Brasil, segundo as estimativas para o ano de 2012, o Câncer Gástrico é o quinto mais incidente (20 mil), responsável por 12.670 casos novos em homens e 7.420, em mulheres, estimativa válida também para o ano de 2013. Na região Norte do Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tumor é o segundo mais frequente em homens (11/100 mil) e para mulheres ocupa a quarta posição (6/100 mil) (INCA/MS, 2011).

No estado do Pará, a neoplasia de estômago ocupa a quarta posição com incidência de 680 casos no ano de 2012. Porém quando as estimativas são segregadas por gênero, este tipo de neoplasia torna-se mais representativo, ocupando o segundo caso mais incidente entre o gênero masculino (430 casos) e o terceiro caso mais incidente entre o gênero feminino (250 casos) (INCA/MS, 2011).

I.4 Câncer de mama

A prevenção primária do câncer de mama ainda não é totalmente possível em razão da variação dos fatores de risco e das características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia (INCA/MS, 2011).

Estudos recentes têm sugerido que um risco aumentado para o câncer de mama pode estar associado com a ingestão na dieta alimentar de elevadas quantidades de gordura, exposição a carcinógenos provenientes de alimentos queimados e com inalação de carcinógenos do fumo do cigarro (Martin and Weber, 2000; Brown *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Romieu, 2011).

O consumo de bebidas alcoólicas é um fator etiológico estabelecido para o câncer de mama. O consumo de três ou mais doses de bebidas alcoólicas por dia aumenta o risco em 30-50%, com a contagem de cada dose ingerida por dia, para um risco de cerca de 7% maior (Martin and Weber, 2000; WHO, 2009; Brown *et al.*, 2010; Conrado *et al.*, 2011).

A obesidade e o etilismo provavelmente são fatores influentes no desenvolvimento de câncer de mama por meio de mecanismos envolvendo os níveis hormonais ou de metabolismo (WHO, 2009; Brown *et al.*, 2010). Além desses, a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, também é considerada um fator de risco, particularmente durante a puberdade, segundo mostram alguns estudos (Martin *et al.*, 2000; INCA/MS, 2011). Alguns fatores de proteção são estudados, como o consumo de soja e de folato (neutralizando o efeito de toxicidade do álcool em indivíduos etilistas) (WHO, 2009).

O câncer de mama masculino é uma doença rara, menos de 1% de todos os pacientes de câncer de mama são homens. Condições que envolvem níveis elevados de estrogênio, como a disfunção gonadal e danos no fígado pelo abuso de álcool e obesidade, são fatores de risco para o câncer de mama em homens (WHO, 2009).

A história familiar de câncer da mama está associada a um aumento de cerca de duas a três vezes no risco de desenvolver essa neoplasia. Alterações em alguns genes responsáveis pela regulação e pelo metabolismo hormonal e reparo de DNA, como, por exemplo, *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* aumentam o risco de desenvolver câncer da mama familiar (INCA/MS, 2011).

Muitos estudos têm relacionando diversos genes a susceptibilidade ao Câncer de Mama. Entre os mais importantes estão vários genes de metabolismo, oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparo do DNA: *NAT2* (Weber and Nathanson, 2000; Sillanpaa *et al.*, 2005; Ochs-balcom *et al.*, 2007; Khedhaier *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010); *CYP2E1*, *CYP2D6*, *CYP2C19*, *mEH* (Khedhaier *et al.*, 2008), *CYP1A1*, *CYP17* (Weber and Nathanson, 2000; Briollais *et al.*, 2007); *GSTM1* e *GTT1* (Weber and Nathanson, 2000), *COMT* (Weber and Nathanson, 2000; Briollais *et al.*, 2007); *MTRR* (Sangrajrang *et al.*, 2010), *RAS* (Weber and Nathanson, 2000), *XPD* (Briollais *et al.*, 2007), *BRCA1* e *BRCA2* (Weber and Nathanson, 2000; INCA/MS, 2011), *XRCC1*, *XRCC3* e *XRCC5* (Weber and Nathanson, 2000), *BRIP1* e *RAD51C* (Wong *et al.*, 2011).

O câncer de mama é caracterizado por uma fase pré-clínica detectável com duração aproximada de 1 a 7 anos, dependendo do subtipo da doença específica. O câncer em fase pré-clínica pode ser detectado pela Mamografia, nesta fase não existem sintomas e o tumor ainda não é palpável. A detecção de tumores e o início do tratamento em fase inicial são associados com uma melhor taxa de sobrevivência

do que os detectados sintomaticamente (ACS, 2013). O diagnóstico precoce pode permitir a cirurgia conservadora da mama e reduzir a necessidade de uma terapia adjuvante e diminuir as complicações relacionadas a um intenso tratamento e recidiva (WHO, 2009). Existem algumas evidências de redução de risco de morte associado à neoplasia de mama, quando mulheres entre 40-49 anos se submetem a mamografia anualmente (WHO, 2009).

O Câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres em todo o mundo, que compreende 23% de todos os cânceres femininos diagnosticados em mais de 1,1 milhões de mulheres a cada ano. É a quinta causa de morte por câncer, com 411.000 óbitos causados anualmente, o que representa mais de 1,6% das mortes em mulheres por todas as causas no mundo (Globocan, 2008; WHO, 2009).

Representa o tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo, com cerca de 4,4 milhões de mulheres diagnosticadas com a neoplasia de mama nos últimos cinco anos estão atualmente vivas. Para o ano de 2010, a estimativa seria que o câncer de mama atingiria 1,5 milhões de casos novos em todo o mundo (WHO, 2009).

No Brasil, o exame clínico anual das mamas e o rastreamento são as estratégias recomendadas para controle do câncer da mama (INCA/MS, 2011). Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer da mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA/MS, 2011).

Mais de 80% das neoplasias de mama tem origem no epitélio ductal, enquanto uma minoria tem origem no epitélio lobular. No entanto, a proporção de carcinomas ductais tem aumentado recentemente (WHO, 2009).

No Brasil, o câncer de mama feminino é o segundo tipo mais incidente (53 mil), com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres, estimativa válida também para o ano de 2013. Na região Norte do país, este tumor ocupa o segundo mais incidente (19/100 mil) em mulheres (INCA/MS, 2011).

No estado do Pará, a neoplasia de Mama apresenta-se como o segundo tipo de Câncer mais incidente no gênero feminino, com 740 casos no ano de 2012. Na capital do estado, a cidade de Belém, o câncer de mama torna-se mais representativo sendo o tipo mais incidente de neoplasia, sem a inclusão dos tipos de Câncer de pele não melanoma (INCA/MS, 2011).

I.5 Marcadores moleculares de susceptibilidade ao câncer

Os marcadores de susceptibilidade genética estão envolvidos em geral com a predisposição ao câncer, logo são excelentes marcadores para avaliar o risco de se desenvolver esta patologia (Almeida, 2007). Polimorfismos que afetam a seqüência codificante dos genes importantes para desenvolvimento neoplásico são muito comuns nas populações, e podem resultar em mudanças que alteram as funções das proteínas (López - Cima *et al.*, 2007).

A susceptibilidade genética pode resultar de polimorfismos herdados, em genes envolvidos em diferentes processos envolvidos na carcinogênese (López - Cima *et al.*, 2007). O fator genético determinante para o desenvolvimento do câncer envolve a contribuição de diferentes genes (efeito poligênico). Quando se estuda particularmente a interação de apenas um destes genes com a susceptibilidade ao câncer, fica evidente que para apenas este gene existe diversos polimorfismos genéticos que estão associados à predisposição desta patologia (Dong *et al.*, 2008).

Abordagens promissoras contra o câncer humano tornam-se disponíveis na era pós-genoma (Murakami, 2009). Os polimorfismos genéticos de base única (*SNPs- single nucleotide polymorphisms*) são vistos como marcadores ideais para estudos de câncer na era pós-genômica por ser o tipo mais comum de variação genética na população.

Os SNPs são definidos como uma mudança de uma única base em uma seqüência de DNA. São polimorfismos pois ocorrem em proporções significativas (mais de 1%) de uma população grande e amplamente distribuídos em todo o genoma, cerca de 12.000.000 são descritos no genoma humano (Brockmoller and Tzvetkov, 2008; NCI, 2012).

Os polimorfismos são alterações genéticas presentes na população em geral, e associam-se normalmente a um fenótipo alterado devido à ausência do produto do gene, ou a alteração da sua atividade específica ou afinidade para os substratos (Costa *et al.*, 2002b).

Em estudos de prevenção do câncer, uma série de associações ao genoma tem sido realizados e vários SNPs que podem predizer susceptibilidade ao câncer foram identificadas com sucesso (Ulrich *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2008).

Recentemente, Dong *et al.* (2008) realizaram uma meta análise de 161 trabalhos na literatura envolvendo 18 diferentes formas de câncer, com um total de

500 indivíduos e 99 genes investigados. Nesta análise foi possível identificar os principais genes envolvidos com processos oncogênicos em diferentes populações mundiais: *ERCC2* (rs13181), *TGFB1* (rs1800470), *RNASEL* (rs627928), *MDM2* (rs2279744), *GSTT1* (rs4630; rs2266637), *NAT2* (rs1801280; rs1799930; rs1799931), *XRCC1* (rs25487), *MTHFR* (rs1801131; rs1801133).

Avanços tecnológicos recentes têm aumentado a velocidade de genotipagem e reduzido seus custos, proporcionando um aumento no número de estudos investigativos de associações entre variantes em genes candidatos e o risco de desenvolvimento do câncer (Dong *et al.*, 2008).

I.6 Genes de susceptibilidade ao câncer

A etiologia do câncer é multifatorial, com fatores genéticos, ambientais, e estilo de vida interagindo para produzir um tumor maligno. O conhecimento da influência genética no câncer é de grande importância para a compreensão da biologia do câncer. Esta auxilia na identificação de indivíduos com risco potencial de desenvolvimento da doença, promove a capacidade de caracterizar as diversas malignidades e estabelecem um tratamento melhor adaptado para a impressão digital molecular da doença, que conduzem ao desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Como consequência, esta base de conhecimento em expansão possui implicações para todos os aspectos do câncer, incluindo a prevenção, rastreio e tratamento. A informação genética fornece um meio de identificar pessoas que têm um risco aumentado de desenvolver câncer (NCI, 2012).

A susceptibilidade genética está direcionada para herdabilidade genética de variações em genes envolvidos na susceptibilidade ao câncer (constitucional ou germinativa), e os efeitos dessa variação no risco de desenvolvimento de câncer para um indivíduo (WHO, 2009).

O ponto principal da carcinogênese consiste em coordenar as mudanças envolvidas na susceptibilidade genética e as alterações ambientais que desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer. A susceptibilidade genética pode conferir em algumas pessoas, uma maior capacidade das células normais sofrerem mudanças, aumentando assim as possibilidades de ocorrerem várias alterações simultaneamente numa única célula. Neste contexto, as transformações ambientais podem atuar como seleção natural para permitir a

sobrevivência dessas células modificadas (WHO, 2009).

Uma grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais. A contribuição exclusivamente genética é responsável por aproximadamente 5% de todos os tumores e a fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a susceptibilidade genética (Ponder, 1990; Knudson, 1991; Louro, 2002).

Os principais genes envolvidos no desenvolvimento do câncer, geralmente estão divididos em três grupos: oncogenes, genes supressores tumorais e os modificadores de risco, genes envolvidos com biotransformação de agentes carcinogênicos. Outros genes que também são importantes no processo de desenvolvimento tumoral por fazerem parte dos marcadores tumorais descritos por Hanahan e Weinberg (2011) são os genes ligados a angiogênese (*VEGF-A*; *TSP-1*; *FGF*), na resposta imune e reparo do DNA.

1.6.1 ONCOGENES

Os oncogenes constituem um grupo de diversos genes cujos produtos têm papéis importantes na regulação de atividades bioquímicas dentro das células, incluindo atividades relacionadas a divisão celular. Conseqüentemente, uma mutação em um oncogene pode comprometer o equilíbrio bioquímico dentro da célula e colocá-la em uma via para tornar-se cancerosa, portanto os oncogenes celulares mutantes estão associados diretamente ao desenvolvimento do câncer (Snustad and Simmons, 2010).

Os oncogenes em sua função normal conduzem processos necessários para a progressão e iniciação tumoral, assim como os processos de invasão e metástase. Geneticamente, os oncogenes são genes que quando sofrem hiper expressão ou mutações de ganho de função, irão promover a tumorigênese (WHO, 2009). Quando os oncogenes sofrem mutações eles mantêm a sua funcionalidade, mas não são mais capazes de responder a sinais normais de regulamentação (Weinberg, 2008).

Exemplos de famílias de oncogenes são: *RAS*, *HER-2*, *MYC* e *BRAF* (WHO, 2009). O *RAS* desempenha um passo essencial para o desenvolvimento de muitos cânceres, fornecendo instruções para uma proteína chamada K-Ras, que está envolvida na regulação da divisão das células (Weinberg, 2008). O Receptor do tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER-2*) induz o crescimento e

desenvolvimento descontrolado das células epiteliais, onde esse crescimento pode levar ao desenvolvimento do câncer. *HER-2* codifica um receptor transmembranar do fator de crescimento da tirosina, cuja expressão se encontra frequentemente aumentada no câncer de mama e em outros tipos de tumores sólidos (Genetics Home Reference, 2013a). O gene *MYC* codificada uma proteína que desempenha papel na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular (Weinberg, 2008). O gene *BRAF*, fornece instruções para codificar uma proteína que ajuda a transmitir sinais químicos a partir do lado de fora da célula para o núcleo da célula. Cerca de 40 % dos melanomas humanos apresentam mutações que afetam a estrutura da proteína B-Raf, resultando na sinalização constitutiva da via *RAF*, através da ativação da proteína quinase. Ocorre um efeito tipo cascata: com mutações no gene *RAF*, sinalização constitutiva e proliferação celular descontrolada (Badalian-Very *et al.*, 2010).

I.6.2 GENES SUPRESSORES TUMORAIS

Os genes supressores tumorais são genes envolvidos no controle do crescimento celular e codificam proteínas que tem papel fundamental na regulação do ciclo celular (Snustad and Simmons, 2010). Em sua função normal, genes supressores tumorais têm seus produtos ativos e funcionam como um freio para suprimir o desenvolvimento do câncer (WHO, 2009). A inativação mutacional desta classe de genes leva a ausência do controle da proliferação celular, o geneticamente significa dizer que são pouco expressos ou sofrem mutações com perda de função, contribuindo desta forma para a tumorigênese (Weinberg, 2008; Snustad and Simmons, 2010).

Exemplos clássicos de gene supressores tumorais envolvidos na predisposição genética ao câncer são: *TP53*, *BRCA1*, *APC*, *PTEN* e *RB* (WHO, 2009). O gene *TP53* (*tumor protein p53*), codifica a proteína p53 que regula o ciclo celular por controlar a divisão celular (Genetics Home Reference, 2013b). Essa regulação acontece pela verificação da p53 da ocorrência de danos no DNA, quando identificados, a p53 se liga diretamente ao DNA danificado sinalizando onde o DNA será reparado, através de uma cascata de reações, e se o dano for irreparável direciona a célula à apoptose prevenindo assim a proliferação de uma célula com DNA alterado e conseqüentemente a probabilidade de aparecimento de um tumor.

(Delbridge *et al.*, 2012). As mutações desse gene são encontradas na maioria dos cânceres.

O *BRCA1* (*breast cancer susceptibility 1*), é um gene supressor de tumor que em sua função normal ajuda a garantir a estabilidade do DNA da célula e ajuda a prevenir a divisão celular sem controle através da ativação de outras proteínas que fazem o reparo do DNA danificado (Genetics Home Reference, 2013c). Uma mutação germinativa no gene *BRCA1* predispõe ao câncer de mama e ovário tanto como à qualquer outro tipo de câncer (Petrucci *et al.*, 2011) mas considera-se como sendo responsáveis por aproximadamente 40% do total de cânceres de mama hereditário e mais de 80% de cânceres de mama e ovário herdados (Billack and Monteiro, 2005).

O *APC* (*adenomatous polyposis coli*) é um gene diretamente ligado à divisão celular, a forma como isso afeta as outras células do tecido e se elas se movimentam dentro ou para fora do tecido, e também, o número correto de cromossomos na divisão celular. e desempenha essas funções através da associação com outras proteínas, especialmente as envolvidas na fixação e sinalização da célula. (Genetics home Reference, 2013d). Mutações neste gene estão relacionadas ao carcinoma de cólon, estômago e pâncreas e polipose intestinal adenomatosa devido a formação de pólipos quando o gene está com sua função reduzida ou ineficaz (Castellsagué *et al.*, 2010).

O *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) codifica uma proteína fosfatase envolvida no processo metabólico que regula a divisão celular e pode levar a célula à apoptose. Evidências sugerem que esta proteína também participa da migração, adesão à tecidos próximos e a formação de vasos na angiogênese, desenvolvendo assim um papel em preservar a estabilidade celular. (Genetics Home Reference, 2013e). Segundo Yin and Shen (2008), mutações germinativas do gene *PTEN* têm sido encontradas com associação na susceptibilidade ao câncer e síndromes como a síndrome de Cowden além de causar mortalidade embrionária.

O *RB1*, codifica a proteína pRB através do controle sobre proteínas que desencadeiam a replicação do DNA, regulando assim, negativamente o ciclo celular ao prevenir a divisão da célula. Além de atuar, em conjunto com outras proteínas sobre a apoptose e a diferenciação celular (Genetics Home Reference, 2013f). Mutações deletérias nesse gene são causas de retinoblastoma, câncer de olho infantil raro, câncer de bexiga e sarcoma osteogênico (Sidle *et al.*, 1996).

I.6.3 GENES MODIFICADORES DE RISCO

Os genes modificadores de risco são uma classe diferente de genes, sua função normal pode modificar o risco ao desenvolvimento do câncer devido a exposição a um agente potencialmente cancerígeno (seja ambiental ou genético). Os exemplos incluem: álcool desidrogenases e acetaldeído desidrogenase que podem modificar o risco da ocorrência do câncer de cabeça e pescoço, atribuível ao consumo de álcool (WHO, 2009).

Muitos xenobióticos que desempenham papel importante na etiologia de doenças podem ser ativados ou inativados por enzimas polimórficas e dependendo do tipo de reação mediada por esta enzima, sua deficiência poderá conferir vantagem ou desvantagem na susceptibilidade a neoplasias (Longuemaux *et al.*, 1999; Resza *et al.*, 2006). A maioria dos agentes mutagênico-carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, ao RNA e as proteínas, as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e fármacos desempenham papel crucial na tumorigênese. Dessa forma, distúrbios no equilíbrio desses processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a alguns compostos. A quantidade efetiva de carcinógenos potencialmente capazes de gerar neoplasias dependem da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxificação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas da célula (Costa, 2002a).

A variação interindividual na resposta aos agentes xenobióticos, aos quais os indivíduos podem ter sido expostos através da dieta, terapia medicamentosa ou exposição ocupacional e os efeitos carcinogênicos potenciais advindos são mediados pela predisposição herdada. Alguns indivíduos ou subgrupos populacionais (por exemplo, etnias) podem apresentar risco significativamente maior de desenvolver câncer quimicamente induzido do que a média populacional devido às diferenças na expressão de genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos (Louro, 2002).

Alguns dos principais genes ligados a metabolização xenobiótica são a família do Citocromo P450 (CYP), as enzimas Glutationa-S-Transferase (GST) e as enzimas N-acetiltransferase (NAT). A superfamília de genes do Citocromo P450 representam uma das principais classes de biotransformação da fase I, através das suas mais de 500 isoenzimas. Essa gama de enzimas participa tanto da biossíntese

como da degradação de esteróides, vitaminas, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, ferormônios e metabólitos vegetais. Metabolizam ainda, inúmeros fármacos e carcinógenos/mutagênicos químicos, entre outros poluentes ambientais, os xenobióticos.

Estima-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450 sendo que cerca de 20 deles estão envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos. Devido à importância do seu papel na ativação metabólica de inúmeros pró-carcinógenos, extensiva pesquisa tem sido concentrada na relação entre a distribuição de variantes polimórficas das diferentes enzimas P450 e a susceptibilidade ao câncer, tendo sido avaliados os genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP2E1*. Os polimorfismos de P450 e a susceptibilidade ao câncer podem estar associados pelo fato dessas isoenzimas participarem da transformação de compostos endógenos relevantes durante os processos de diferenciação da célula transformada, até o estágio maligno (Louro, 2002).

As enzimas denominadas de fase II estão envolvidas nos processos de detoxificação, uma das principais são as Glutaciona-transferases que desempenham um papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com as glutacionas como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e fármacos citotóxicos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros impedindo a ligação destes ao DNA. Tais compostos eletrofílicos reativos podem ser resultantes ainda de processos endógenos. É possível concluir que essas enzimas desempenham uma função protetora contra os radicais livres.

Dentre as enzimas Glutaciona-S-Transferases (GST) mais conhecidas estão, as GSTM1 e GSTT1. Como essas enzimas catalisam a conjugação da glutaciona com xenobióticos, sua ausência poderia reduzir a capacidade de um organismo detoxificar metabólitos reativos. Os polimorfismos das GSTs modulam o risco de desenvolvimento de algumas neoplasias, porém alguns estudos vêm buscando esclarecer a exata participação dos mesmos na carcinogênese humana (Weber and Nathanson, 2000).

A enzima N-acetiltransferase 2 intervém na fase II do metabolismo de carcinógenos sendo responsável pela biotransformação de várias aminas

aromáticas e heterocíclicas (Hein *et al.*, 1993; Costa, 2002b). Diversas investigações na literatura evidenciam a importância do gene *NAT2* para o papel de metabolizar agentes xenobióticos carcinogênicos e conseqüentemente para o desenvolvimento diferentes formas de neoplasias (He *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2006; Zang *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2008).

Apesar de todos os estudos existentes sobre as diversas formas de câncer e da diversidade de genes envolvidos na carcinogênese, muitos tipos de cânceres não podem ser associados a apenas um gene específico. É provável que vários e diferentes genes estejam envolvidos no desenvolvimento do câncer.

As expectativas são de que sejam alcançados a maioria dos conhecimentos sobre o papel das mudanças genéticas no desenvolvimento do câncer, o que pode levar ao tratamento direcionado contra o câncer e melhorar as estratégias utilizadas para prevenção das neoplasias (ASCO, 2012).

1.6.3.1 O gene *NAT2*

O gene N-acetiltransferase 2 possui dois éxons que compõem uma seqüência de 1.861 pares de nucleotídeos (figura 3) (Grant *et al.*, 1989). Na revisão da literatura identificou-se pelo menos sete SNPs que determinam a variação genética neste gene (Human *NAT2* alleles <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>).

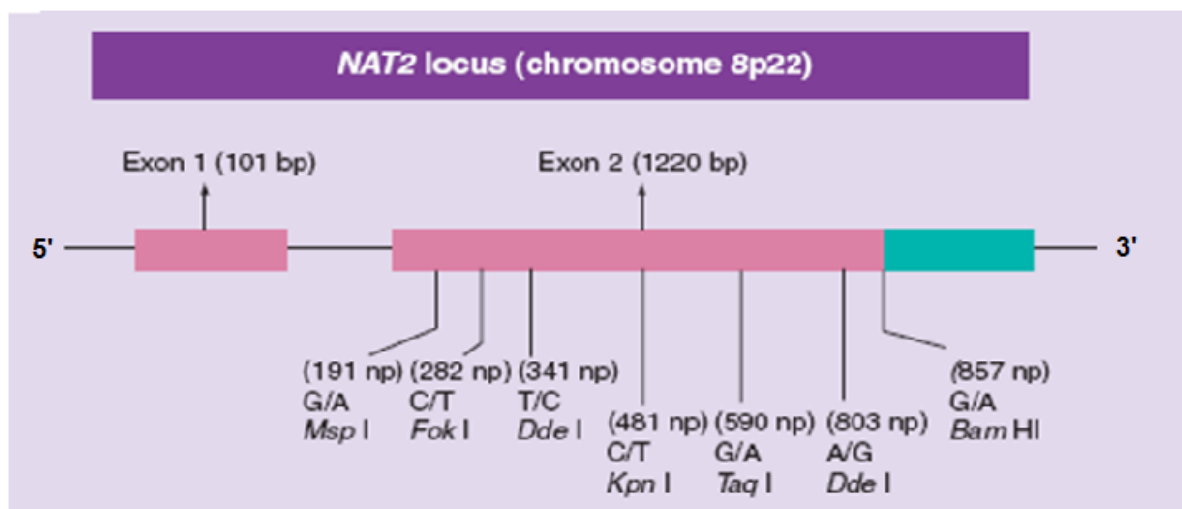


Figura 3. Representação da estrutura do gene *NAT2* e seus principais polimorfismos relacionados.
 Fonte: Roy *et al.*, 2008.

A enzima NAT2 pertence ao grupo das Arilaminas N-acetiltransferases (NATs) e intervém na fase II do metabolismo de carcinógenos, sendo responsável pela biotransformação de várias aminas aromáticas e heterocíclicas. A NAT2 catalisa reações de acetilação de arilaminas e hidrazinas, as quais incluem compostos carcinogênicos e fármacos, respectivamente (Hein *et al.*, 1993; Costa, 2002a). Nos humanos a acetilação é a principal via de biotransformação de algumas drogas e essencialmente de inúmeros carcinógenos presentes na dieta, no fumo do cigarro e no ambiente (Hein *et al.*, 1993).

A NAT2 é expressa principalmente no fígado e no epitélio intestinal, dos sítios tradicionais de metabolização de fármacos. Nos últimos anos, diversos trabalhos demonstraram a existência de variações genéticas interindividuais que determinam diferenças da função e da expressão da enzima NAT2 que por sua vez geram variabilidade na acetilação de fármacos e outros xenobióticos.

Pelo menos cinco polimorfismos do gene *NAT2* estão relacionados com a capacidade da enzima de metabolização de xenobióticos potencialmente cancerígenos (C282T, T341C, C481T, A803G e G857A) e a combinação destes polimorfismos determina a velocidade de acetilação do xenobiótico (Roy *et al.*, 2008; Possuelo *et al.*, 2008).

Entre os grupos de fenótipo do *NAT2*, essencialmente três tipos são definidos: rápido, lento e os intermediários, o último sendo heterozigoto e portador de um alelo do tipo selvagem (Gil and Lechner, 1998). O fenótipo é determinado a partir da combinação das principais mutações observadas de acordo com o site de nomenclatura do gene *NAT2* (Human *NAT2* alleles <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>). O perfil de acetilação do *NAT2* define a ação do gene na metabolização de agentes químicos que potencialmente podem transformar-se em carcinogênicos.

A acetilação de *NAT2* é considerado um fator de risco potencial na etiologia de certas doenças malignas multifatoriais somado à exposição a agentes químicos, incluindo o tabagismo. Diversos trabalhos na literatura indicam que a velocidade de acetilação do gene *NAT2* está relacionada com a variabilidade de cinco principais SNPs: C282T, T341C, C481T, A803G e G857A (Fuselli *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Zang *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2008; Walraven *et al.*, 2008).

A susceptibilidade a alguns tipos de câncer têm sido associada aos fenótipos de acetilação rápida ou lenta desse gene (Upton *et al.*, 2001; Kita *et al.*, 2001; Hein

et al., 2002; Huang *et al.*, 2002; Fernandez – Villar *et al.*, 2003; Alberg *et al.*, 2004; Donald *et al.*, 2004; Dupret and Rodrigues-Lima, 2005; Sandy *et al.*, 2005; Shakya *et al.*, 2005; Shaaf *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2006; Khedhaier *et al.*, 2008).

I.6.3.2 Diversidade genética do gene *NAT2*

Muitos estudos têm explorado a diversidade genética do gene *NAT2* em diferentes grupos étnicos populacionais (Teixeira *et al.*, 2007). Variações na frequência de genótipos e fenótipos do gene *NAT2* em diferentes populações étnicas foram bem descritas em vários estudos realizados em diferentes regiões geográficas do mundo (Teixeira *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2010; Sabbagh *et al.*, 2008). Estes estudos incluíram populações com altas frequências de alelos de acetilação lenta, tais como descendentes das populações europeias e africanas, e outras que são caracterizadas por altas frequências do alelo de acetilação rápida, incluindo asiáticos e ameríndios.

Poucos estudos foram realizados com a população brasileira (Teixeira *et al.*, 2010). O Brasil possui uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de mistura étnica de populações de três continentes principais: os colonizadores europeus representados principalmente pela população de Portugal, os escravos africanos e os Ameríndios nativos. Assim, a mistura de etnias é presente em todo o país com predominância de certos grupos, dependendo da região. Devido a grande diversidade de distribuição alélica do gene *NAT2* relacionada a miscigenação da população brasileira é consistente se esperar que sejam encontrados diferentes formas de acetilação nas diferentes regiões do Brasil (Teixeira *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013).

Um estudo de Sabbagh *et al.* (2011), fez uma análise da diversidade genética do *NAT2* e descreve a frequência dos haplótipos em indivíduos representativos de 128 populações humanas, de cinco diferentes regiões continentais: África, Europa, Ásia, América e Oceania (figura 4). As populações africanas foram caracterizadas por uma baixa frequência do haplótipo ancestral do *NAT2* (*4), assim como uma alta prevalência de outros dois haplótipos rápidos, *12A e *13A (Sabbagh *et al.*, 2011).

Os haplótipos *NAT2* *5B e *6A associados ao fenótipo de acetilação lenta,

foram largamente predominantes em populações europeias comparados ao haplótipo selvagem *NAT2* *4 (Sabbagh *et al.*, 2011). Em asiáticos, tanto *NAT2**6 e *NAT2**7 foram os principais responsáveis pelo fenótipo de acetilação lenta, enquanto o haplótipo *NAT2**5 foi raramente encontrado (Teixeira *et al.*, 2007; Sabbagh *et al.*, 2008). Em ameríndios, *NAT2**7B foi o principal alelo responsável pelo perfil de acetilação lenta (Teixeira *et al.*, 2007). A figura 4 mostra claramente que as populações da África exibem maior diversidade de haplótipos, quando comparadas as populações da Europa ou Asiáticos, onde poucos haplótipos são encontrados assim como, *NAT2**4, *NAT2**6 A e 7B (Sabbagh *et al.*, 2011).

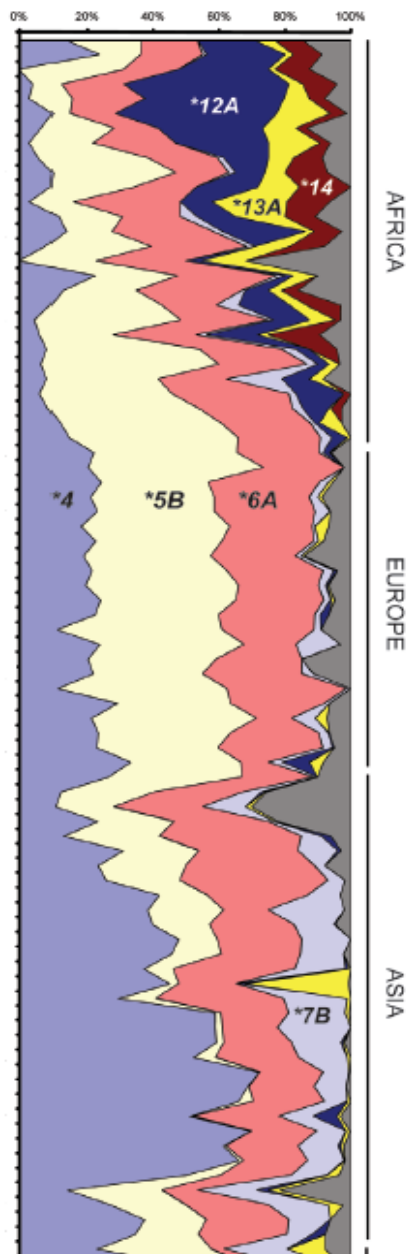


Figura 4. Distribuição de frequências de haplótipos do gene *NAT2* em amostras de várias populações incluídas na pesquisa de diversidade mundial.

Modificado de Sabbagh *et al.*, 2011.

Alguns polimorfismos de gene *NAT2* podem ser encontrados em maior frequência em algumas populações ancestrais, como T341C, C481T e A803G, que são comumente encontrados em descendentes europeus e africanos, também foram frequentemente observadas em brasileiros. O polimorfismo C282T do gene *NAT2* é comumente encontrado em descendentes europeus e o G857A, embora relativamente incomum na maioria das populações ancestrais, está presente em uma alta frequência em asiáticos e ameríndios. Em brasileiros a frequência do SNP T341C do gene *NAT2* foi encontrado em maior frequência em descendentes de asiáticos e populações ameríndias e o polimorfismo G857A foi maior em brasileiros com maior descendência européia (Teixeira *et al.*, 2007).

Estudos genômicos têm fornecido fortes evidências de que os processos culturais podem ter um impacto profundo sobre o genoma do ser humano, provocando mudanças significativas nas frequências alélicas em resposta a condições ambientais culturalmente modificadas (Sabbagh *et al.*, 2011). Em particular, o desenvolvimento dos sistemas de subsistência agrícolas, é considerado um dos principais fatores que provocaram mudanças profundas na dieta e exposição humana aos compostos xenobióticos, levando a um novo processo de deleção que afeta diversas vias metabólicas (Sabbagh *et al.*, 2011).

O gene *NAT2* pode representar um exemplo de um gene exposto a pressões seletivas dirigidas culturalmente resultantes da exposição dietética e da presença de novos xenobióticos (Sabbagh *et al.*, 2011). Vários exemplos mostram a influência de diferenças culturais sobre os padrões de fluxo de genes entre populações humanas e portanto sobre os padrões de variação genética (Sabbagh *et al.*, 2011).

Um estudo de Sabbagh *et al.* (2011) fez uma análise da diversidade genética do gene *NAT2* e descreveu a frequência de haplótipos em indivíduos representativos de 128 populações humanas, de cinco diferentes regiões continentais: África, Europa, Ásia, América e Oceania. As populações africanas foram caracterizadas por uma baixa frequência do haplótipo ancestral *NAT2* (*4), juntamente com uma alta prevalência de outros dois haplótipos rápidos, *NAT2* *12A e *13A. Os haplótipos *NAT2* *5B e *6A associados ao fenótipo de lenta acetilação, são largamente predominantes em populações européias comparados ao haplótipo selvagem *NAT2* *4 (Sabbagh *et al.*, 2011).

A alta incidência de acetilação lenta pode representar uma adaptação

genética para os novos hábitos alimentares e estilo de vida introduzida pela transição populacional para a agricultura. Por exemplo, as alterações na temperatura à qual a carne e o peixe são cozidos para a ingestão humana modificam a exposição a carcinógenos exógenos, tais como aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e uma taxa mais lenta de acetilação poderia ter constituído um modo eficiente para evitar o efeito de danos das supostas substâncias cancerígenas que podem ser ativadas através da acetilação de *NAT2* (Sabbagh *et al.*, 2011).

I.6.3.3 O gene *NAT2* e a susceptibilidade ao câncer

O entendimento dos mecanismos de atuação das N-acetiltransferases 2 teve início a partir dos estudos do locus do gene *NAT2* e de suas variantes alélicas que foram correlacionadas às diferentes capacidades de acetilação (Louro, 2002).

As enzimas N-acetiltransferases (NATs) catalisam o metabolismo de xenobióticos e carcinógenos pela transferência de um grupo acetil aos mesmos. E ainda são responsáveis pela catálise de N- e O- acetilação, e também pela N.O-transacetilação dos seus substratos. Desse modo, participam da detoxificação de carcinógenos, via N-acetilação. No entanto também são capazes de bioativar alguns substratos carcinógenos, via O-acetilação ou N.O-transacetilação, dependendo da via metabólica que é funcionalmente relevante no tecido alvo (Hein *et al.*, 1994; Bowden and Fischer, 1997; Costa, 2002a).

Se comparadas as enzimas NATs aos CYPs e GSTs, a variedade de compostos metabolizados pelas NATs é limitada consistindo principalmente de aminas aromáticas e heterocíclicas e hidrazinas. Contudo, muitos destes compostos são carcinógenos potentes e muito utilizados em processos industriais, tais como a produção da borracha e de corantes, antioxidantes e pesticidas, enquanto outros são formados no processo de cocção ou, ainda durante o consumo do cigarro. Uma vez que as NATs são o principal sistema enzimático metabolizador destes compostos fica clara sua importância na carcinogênese humana (Louro, 2002).

Os polimorfismos humanos para os mecanismos de N-acetilação são verificados nas variações individuais durante a metabolização de diferentes substratos, incluindo a sulfametazina, a isoniazida e a cafeína. Tais diferenças permitem a distinção dos indivíduos pelo fenótipo em rápidos ou lentos acetiladores

(Louro, 2002).

A enzima NAT2 realiza importante função nos mecanismos de detoxificação, estando presente em diferentes tecidos, o que sugere sua participação como enzima protetora perante a exposição carcinogênica (Louro, 2002). Vários estudos tem demonstrados a expressão da enzima NAT2 em diferentes tecidos (Windmill *et al.*, 2000; Agúndez *et al.*, 1998), refletindo o fato de que efeito do fenótipo e genótipo de acetilação no risco de desenvolver câncer, pode variar com o local do órgão.

As enzimas NATs contribuem para a carcinogênese química, seu modo de atuação depende do tipo de exposição, tipo de tecido ou neoplasia em questão e ainda de outras vias metabólicas que podem competir pelos substratos das NATs. Entre essas vias estão as reações de hidroxilação catalisadas pelas enzimas CYP1A2 para as aminas heterocíclicas e as reações de conjugação e dissociação realizadas pela UDP-glucuroniltransferases e β -glucuronidases, respectivamente. Portanto, permanece incerta a contribuição do produto destes genes no metabolismo de vários carcinógenos nos diferentes tecidos. O desenvolvimento de metodologias apropriadas para análise do gene *NAT2* deve tornar possível a correlação genótipo-fenótipo em situações de exposição a diferentes carcinógenos e na subsequente associação com diferentes neoplasias (Louro, 2002).

1.7 Controle genômico de ancestralidade em investigações do tipo caso- controle

Historicamente, características como “cor da pele”, “raça” ou “etnia” foram utilizadas para realizar inferências sobre a estrutura das populações humanas (Cooper, 1994; Aspinall, 1998). Diferentes interpretações para esses resultados sugeriram que os dados disponíveis eram insuficientes para justificar as inferências feitas (Risch *et al.*, 2002). Recentemente duas investigações procuraram definir a quantidade de dados necessários para identificar a estrutura populacional e a possibilidade de determinar o continente de origem de um indivíduo acuradamente.

Rosenberg *et al.* (2002) estudaram 400 *locus* de microssatélites autossômicos em 1056 indivíduos de 52 populações e concluíram que há estrutura genética geográfica substancial entre as populações continentais. Os autores, utilizando um algoritmo Bayesiano, identificaram consistentemente cinco grupos humanos. Dentro desses grupos a maior diferenciação ocorreu entre 41 subpopulações de nativos americanos, seguidos pelas da Oceania e África

subsaariana. As subpopulações europeias foram as mais similares entre si. Esse trabalho foi corroborado pelo de Bamshad *et al.* (2003) que utilizando outras amostras, genotipadas para outros 100 *locus* de microssatélites e 60 marcadores bialélicos, também verificaram a ocorrência de estrutura genética entre amostras de diferentes continentes. Nesse trabalho, as amostras da África subsaariana classificaram-se em dois agrupamentos distintos.

De acordo com Rosenberg *et al.* (2002) a estimativa da variância dentro do grupo afeta o número de *locus* necessários para corretamente identificar os agrupamentos populacionais assim como o continente de origem de um indivíduo. Eles estimaram, por exemplo, que enquanto para a África cerca de 200 *locus* foram necessários, na América apenas 100 *locus* foram suficientes para identificar corretamente um indivíduo ao continente. Esses autores ainda afirmam que o número de *locus* poderia ser menor se marcadores mais informativos fossem genotipados.

Bamshad *et al.* (2003) verificaram que 60 marcadores eram suficientes para identificar o continente de origem de um indivíduo com 90% de probabilidade mesmo em populações miscigenadas. Essa estimativa chegava aos 100% com 100 ou mais marcadores. Nesse estudo foi observado, que não havia diferenças de poder estatístico para detectar estrutura populacional e continente de origem entre marcadores bialélicos e microssatélites.

A partir desses estudos vários pontos importantes foram corroborados enquanto novos emergiram e levantaram novas questões: 1) Em geral a diferenciação genética entre grupos nativos segue a distância geográfica; 2) A maior diferenciação ocorre entre continentes, logo a classificação dos indivíduos em grupos étnicos traz informação sobre ancestralidade genética (Risch *et al.*, 2002); 3) O subestruturamento populacional dentro dos grupos étnicos principais ocorre em vários graus; 4) Em populações que migraram e miscigenaram recentemente como as dos Estados Unidos e da América Latina nas quais a estrutura populacional torna-se mais complexa, a etnicidade auto-declarada pode ser um preditor menos acurado de ancestralidade genética (Ziv and Burcharel, 2003).

O grande desafio para decifrar aspectos evolutivos da história humana é utilizar a pequena quantidade de diferenciação genética entre populações para inferir a história das migrações. Os padrões de estrutura das populações humanas modernas poderão ser utilizados para guiar a construção de modelos históricos de

migração e miscigenação que poderão ser úteis para inferências sobre a história genética humana.

A idéia de que marcadores genéticos existam em uma população e não em outra foi inicialmente apresentada por Neel (1973), que se referiu a esses marcadores como “privados” e os utilizou para estimar taxa de mutação. Chakraborty *et al.* (1991) designaram as variantes que são encontradas em apenas uma população como “alelos únicos” sugerindo a utilização dos mesmos para estimativas de fluxo gênico.

Mais recentemente, Schriver *et al.* (1997) usaram a designação “alelos população-específicos” (PSA) ou “marcadores informativos de ancestralidade” (IAM) para descrever os marcadores genéticos com grandes diferenciais de frequências alélicas entre os grupos humanos. De acordo com esses autores essas diferenças deveriam ser maiores que 50% entre duas populações étnicas ou geograficamente definidas para um marcador ser considerado informativo de ancestralidade.

A maneira mais eficiente para estudar associação de alelos específicos com diferentes doenças são os estudos do tipo caso-controle utilizando-se de genes candidatos, que podem ter sido identificados na base de conhecimento sobre a carcinogênese ou em varreduras (*screens*) genômicas com marcadores polimórficos. Os estudos do tipo caso-controle apresentam uma série de vantagens: são mais fáceis de executar e menos dispendiosos que estudos de coortes e apresentam maior poder do que estes últimos para eventos menos comuns. Assim eles tornaram-se padrão para estudos epidemiológicos de identificação de genes envolvidos na susceptibilidade. Por outro lado, estudos de caso-controle apresentam a distinta desvantagem de serem notoriamente susceptíveis a vieses de subestruturação de populações aos efeitos da susceptibilidade genética ao câncer.

Em geral, a formação de subpopulações (também chamada estratificação) ocorre porque a população não é panmítica, mas composta de inúmeros grupos reprodutivos, muitas vezes não randômicos. Isto é especialmente significativo em populações formadas por mistura de duas ou mais populações ancestrais, como sabemos ser o caso da população brasileira que é uma mistura de populações fundadoras ameríndias, européias e africanas (com uma pequena contribuição asiática mais recente). Neste caso, as proporções relativas de ancestralidade de cada indivíduo variam.

Se o risco de uma doença ou a predisposição genética variam com as proporções de miscigenação (ou seja, se há diferenças entre as populações ancestrais) isto levará à confusão de associações do fenótipo com o genótipo em qualquer *locus* no qual as frequências alélicas diferem entre as populações ancestrais.

A estratificação populacional existe quando a população em questão é constituída pela mistura de diferentes grupos de populações (europeus e africanos, por exemplo) que normalmente são denominadas de subpopulações e quando a proporção de mistura, definida como a proporção do genoma que teve origem em cada subpopulação, varia entre indivíduos (Kittles *et al.*, 2002).

Um dos exemplos mais conhecidos de associação espúria foi o da associação do câncer de próstata com polimorfismos do gene *CYP3A4*, entre negros americanos (Kittles *et al.*, 2002). Uma importante consequência para estudos de susceptibilidade ao câncer é a inadequação da extrapolação livre de dados colhidos em populações relativamente homogêneas.

Uma estratégia eficaz e largamente utilizada na literatura, hoje considerada a mais custo-eficiente é a de “controles genômicos”, que se baseia na idéia que se existe estratificação, a mesma causará associações espúrias não só com o gene candidato, mas também com outros genes que não são geneticamente ligados a ele.

Vamos imaginar a situação em que tenha sido observada uma estatística de associação significativa entre um fenótipo e um gene candidato, por exemplo, um valor nominalmente elevado de qui-quadrado. Para verificar se esta estatística elevada significa realmente a presença de associação, repetimos o teste com inúmeros outros marcadores em diferentes cromossomos que agem como “controles genômicos”.

Caso o valor do qui-quadrado seja muito mais elevado com o gene candidato do que com os outros marcadores, temos uma forte indicação que o gene candidato é responsável pelo fenótipo ou está em desequilíbrio de ligação com o gene ou genes responsáveis pela associação. Por outro lado, se o valor de qui-quadrado do candidato não for muito diferente daquele dos outros marcadores, poder-se-á concluir que a associação putativa pode ser devida apenas à estratificação. Esta estratégia foi delineada por vários autores entre os quais Reich and Goldstein (2001), os quais mostraram que se dividirmos o valor do qui-quadrado (χ^2) do gene

candidato pelo valor médio de χ^2 dos outros marcadores, podemos obter um valor corrigido que elimina os efeitos da presença de estratificação.

O número de marcadores exigidos para estimar o efeito da subestruturação populacional depende de dois fatores principais: do painel de marcadores escolhidos (quanto esses marcadores diferem nas subpopulações ancestrais); e da associação do traço e/ou doença investigado com uma, ou mais, das subpopulações (quanto esta característica é mais comum em um determinado grupo ancestral).

Cálculos que empregam análises de máxima verossimilhança sobre as estimativas de mistura individual mostraram que em populações formadas pela mistura de duas subpopulações aproximadamente 40 marcadores bialélicos, com média de valores de delta (Δ) (diferenças das frequências alélicas nas populações ancestrais) em torno de 60%, são requeridos para medir com precisão a proporção de mistura de cada indivíduo.

Os sistemas bialélicos de inserção e deleção (INDEL) são mais fáceis de investigar, principalmente na forma de sistemas multiplex. Como as inserções podem apresentar tamanhos muito diferentes (de um até dezenas de nucleotídeos) é possível combinar o tamanho do amplicon em função do tamanho da inserção e ajustar ambos com os diferentes tipos de fluorocromos de forma a genotipar com relativa facilidade até quinze marcadores simultaneamente.

I.8. Aplicabilidade do estudo na prática clínica

No Brasil, as estimativas de câncer para o ano de 2012, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer gástrico configura-se como o quarto tipo de neoplasia mais incidente no mundo (Parkin, 2011; WHO, 2009). Na região Norte do Brasil, o câncer gástrico se apresenta como um problema grave de saúde pública com elevada prevalência e mortalidade associada a esta neoplasia (Silva *et al.*, 2012). Mundialmente, o câncer de mama está relacionado à maior incidência e causa de mortalidade em mulheres (WHO, 2009).

A sobrevida baixa de pacientes com neoplasias deve-se ao diagnóstico ocorrer geralmente em estágio avançado. O diagnóstico precoce resulta em significativa diminuição da mortalidade decorrente dessa doença. Entretanto, o diagnóstico nesse

estádio é raro devido ser assintomático. Para modificação deste panorama, o rastreamento entre grupos de alto risco é necessário para a aplicação de testes preditivos e detecção precoce do câncer (INCA/MS, 2011).

O desenvolvimento de biomarcadores preditivos para o câncer, pode ajudar a prever a probabilidade de um indivíduo desenvolver câncer em sua vida, o que pode ajudar a compreender a causa do câncer e do risco de desenvolver câncer no futuro, ou passá-lo para a próxima geração.

As pessoas avaliadas com prognóstico desfavorável (baseado em marcadores moleculares) podem ter a opção de realizar exames preventivos para o câncer mais frequentemente e evitar fatores de risco específicos, modificando o estilo de vida para diminuir o risco adicional, ou tomar medicação preventiva (quimioprofilaxia), se disponível. Em alguns casos, as pessoas com uma predisposição genética a desenvolver câncer podem ter a oportunidade de reduzir esse risco (NCI, 2012).

A aplicação de biomarcadores moleculares na prática clínica como fator de risco no desenvolvimento neoplásico pode revolucionar o entendimento das neoplasias, criar subsídios para novos alvos terapêuticos e reduzir custos desnecessários com terapias e internações (Chang *et al.*, 2012; Yuzhalin and Kutikhin, 2012; Schneider *et al.*, 2012; Skorodumova *et al.*, 2012; Craven *et al.*, 2012, Willard and Koochekpour, 2012, Thumar *et al.*, 2012; Hawley *et al.*, 2013).

Abordagens promissoras contra o câncer humano tornam-se disponíveis na era pós-genoma (Murakami, 2009). Os polimorfismos genéticos de base única (SNPs) são vistos como marcadores ideais para estudos de câncer na era pós-genômica por ser o tipo mais comum de variação genética e amplamente distribuídos em todo o genoma, cerca de 12.000.000 de SNPs são descritos no genoma humano (Brockmoller and Tzvetkov, 2008).

Para a prevenção do câncer, uma série de estudos de associação ao genoma são realizados e vários SNPs que poderiam prever suscetibilidade de câncer foram identificadas com sucesso (Ulrich *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2008).

O gene *NAT2*, é considerado um modificador de risco, pois em sua função normal modula o risco ao desenvolvimento do câncer por estar envolvido na metabolização de agentes potencialmente carcinogênicos (WHO, 2009; Khedhaierr, 2008, Zhang *et al.*, 2010, Teixeira *et al.*, 2010, Hein, 2009). Variações genéticas, como SNPs, resultam na produção de enzimas com atividade modificada, levando a

variação na velocidade de acetilação de xenobióticos potencialmente carcinogênicos (Borlak and Reamon-Buettner, 2006; Hein, 2009; Eichholzer *et al.*, 2012).

A enzima NAT2 é responsável pela biotransformação de diferentes xenobióticos que maioria da população mundial é exposta como: aminas aromáticas e heterocíclicas envolvidas principalmente no hábito de fumar e comer carne bem cozida (Ochs-Balcom *et al.*, 2007, Zang *et al.*, 2007, Silanpaa *et al.*, 2005).

Para compreender e controlar as neoplasias são necessários conhecimentos científicos aliados a um melhor uso dos recursos disponíveis para o planejamento, execução e avaliação das estratégias de controle da doença. Atualmente, o controle e a prevenção do câncer estão entre os maiores desafios lançados à ciência e à gestão pública (INCA/MS, 2011).

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Desenvolvimento de um painel de marcadores genéticos associados à susceptibilidade e farmacogenética do câncer gástrico no estado do Pará”, aprovado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Pará, que pretende investigar diferentes genes candidatos a susceptibilidade ao câncer na população do estado do Pará.

O projeto tem como objetivo formar bases metodológicas e científicas para o desenvolvimento de um painel de marcadores genéticos capazes de fornecer prognóstico para o desenvolvimento de diferentes formas de câncer.

O painel de marcadores elaborado nessa pesquisa por não ser um procedimento invasivo poderia ser usado em um programa de rastreamento em populações de alto risco o que diminuiria custos ao SUS.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi verificar uma possível associação entre os SNPS do gene *NAT2* e a susceptibilidade ao acometimento de Adenocarcinoma gástrico ou Carcinoma ductal invasivo da mama em pacientes da região norte do Brasil.

II.2 Objetivos específicos

1. Investigar e comparar a distribuição de frequências dos genótipos do gene *NAT2* em pacientes com câncer gástrico ou de mama e indivíduos controles.
2. Investigar os cinco principais polimorfismos (A803G; G857A; C282T; T341C; C481T) do gene *NAT2* e sua possível associação com duas formas distintas de neoplasias (Gástrica e Mama).
3. Determinar as frequências de SNPs, haplótipos e genótipos do gene *NAT2* em pacientes com Câncer Gástrico ou de Mama e indivíduos controles da população de Belém-PA.
4. Verificar o efeito sinérgico entre as cinco mutações investigadas, em associação com a susceptibilidade ao câncer.
5. Utilizar os marcadores INDEL do tipo IAM, como método de controle genômico para o pareamento de ancestralidade individual entre o grupo caso e controle em estudo de associação de genes candidatos a doenças complexas (Susceptibilidade ao câncer do gene *NAT2*).

CAPÍTULO III

**ASSOCIATION OF SLOW ACETYLATION PROFILE OF *NAT2*
WITH BREAST AND GASTRIC CANCER RISK IN BRAZIL**

Association of Slow Acetylation Profile of *NAT2* with Breast and Gastric Cancer Risk in Brazil

MARIANNE RODRIGUES FERNANDES^{1,2}, DARLEN CARDOSO DE CARVALHO^{1,2},
 ÂNDREA KELLY CAMPOS RIBEIRO DOS SANTOS^{1,2},
 SIDNEY EMANUEL BATISTA DOS SANTOS^{1,2}, PAULO PIMENTEL DE ASSUMPÇÃO^{1,3},
 ROMMEL MARIO RODRIGUEZ BURBANO^{1,4} and NEY PEREIRA CARNEIRO DOS SANTOS^{1,2}

¹Research Center of Oncology, Federal University of Pará, Belém, Brazil;

²Laboratory of Human and Medical Genetics, Institute of Biological Sciences;

³João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará, Belém, Brazil and

⁴Laboratory of Human Cytogenetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil

Abstract. *Background:* The *N*-acetyltransferase 2 (*NAT2*) gene is a marker for the study of interindividual susceptibility to developing neoplasias. The purpose of this study was to verify a possible association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *NAT2* and the susceptibility to gastric cancer (GC) and breast cancer (BC) in patients from the North region of Brazil. *Materials and Methods:* Five SNPs of the *NAT2* gene were investigated by direct sequencing. Ancestry was estimated by analysis of a panel with 48 ancestry-informative markers (AIM). *Results:* Individuals with slow acetylation profile had an increased risk of developing neoplasias up to three times when compared to controls. *Conclusion:* In this study, slow acetylation profile was found to strongly influence susceptibility to GC and BC.

Gastric cancer (GC) is the fourth most common type of neoplasias worldwide (1, 2) and breast cancer (BC) has the highest incidence and is the leading cause of female death (2). In Brazil, GC represents the fifth most common type of tumor among the male population and BC is the second most common among the female population (3). Studies of genetic susceptibility to cancer using single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the genes that encode the enzymes responsible for the biotransformation of carcinogenic agents may identify the at-risk population and help to clarify the etiology of a given

tumor type (4-6). *N*-acetyltransferase 2 gene is a marker for the study of interindividual susceptibility to develop neoplasias; the enzyme *NAT2* takes part in the metabolism of carcinogenic agents and SNPs of its gene produce enzymes with different activities, leading to slow or fast acetylation of xenobiotics, such as aromatic and heterocyclic amines (7-9). The purpose of this study was to verify a possible association between SNPs of *NAT2* gene and the susceptibility to GC and BC in patients from the North region of Brazil. An ancestry genomic assay of case and control samples was carried out to estimate the individual inter-ethnic admixture for the volunteers taking part in this study.

Materials and Methods

Study population. The investigated participants were chosen according to a case control study. The sample cohort consisted of 63 patients from João de Barros Barreto University Hospital, all of them were diagnosed with gastric adenocarcinoma, and 70 patients from Ophir Loyola Hospital, diagnosed with invasive ductal breast carcinoma, both hospitals located in the city of Belém, Brazil. For both groups, risk factors related to the development of neoplasias were established, such as advanced age and gender. For the case group, we also collected other risk factors for the development of neoplasia, such as alcoholism and tobaccoism. The study control population was composed of 89 participants without cancer, living in the North region of Brazil. The protocol used in this study was approved by the Committee of Research Ethics from the João de Barros Barreto University Hospital (protocol number 3505/2004) for gastric cancer samples and by the Committee of Research Ethics from the Tropical Medicine Center of Federal University of Pará (protocol number 043/2008) for breast cancer samples. All patients recruited for this study provided written informed consent to their participation.

Genomic DNA extraction. From each participant, 5 ml of peripheral blood was collected by using EDTA as anticoagulant. DNA extraction was carried out according to the method described by Sambrook *et al.* (10), with modifications. The concentration of DNA was estimated by

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Marianne Rodrigues Fernandes, Research Center of Oncology, Federal University of Pará, Belém, Brazil. E-mail: fernandesmr@yahoo.com.br

Key Words: *NAT2*, cancer susceptibility, SNP, IAM, breast cancer, gastric cancer.

the use of a GeneQuant RNA/DNA spectrophotometer (Amersham, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK).

Genotyping of NAT2 gene. Five polymorphisms of great importance for the definition of NAT2 profile (C282T, T341C, C481T, A803G and G857A) were investigated by direct sequencing of 986 base pairs, amplified in two reactions, with the following primers: NAT2-1F (5'-TTA ATT CTC ATC TCC TGC CAA AGA-3'), NAT2-1R (5'-TCA CTC TGC TTC CCA AGA TAA TCA-3'); NAT2-2F (5'-ATG GAG TTG GGC TTA GAG GCT AT-3'), NAT2-2R (5'-CTT TGG CAG GAG ATG AGA ATT AAG A-3'). The choice of the primers was made by using the software Primer 3 (11). An amplification was carried out in an ABI Verity thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The standard protocol used: 20 pmol of each oligonucleotide, 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM each dNTP, 3 U Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 100 ng of genomic DNA in a 25 µl reaction volume. Samples were incubated at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 2 min, 60°C for 1 min and 70°C for 2 min, with a final extension at 70°C for 30 min. Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels. PCR products were purified with Purelink kit (Invitrogen Life Technologies). Sequencing was carried out on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The obtained sequences were analyzed for the identification of SNP by alignment with the reference sequence (GenBank accession X14672). The nomenclature of NAT2 genotype is given in accordance with that described in 'The Consensus Gene Nomenclature of Human NAT2 Alleles' (12).

Estimates of individual inter-ethnic admixture. The population from the North region of Brazil, the target of this study, is composed of an inter-ethnic admixture of three ancestry populations: African, European and Native American (13). In order to avoid spurious interpretations resulting from the population substructure, we used a panel with 48 AIMs (13). In this way, we estimated the individual inter-ethnic admixture and checked the ancestry for the study's case and control samples.

Statistical analysis. Allele frequencies at individual loci were estimated by the Hardy-Weinberg equilibrium exact test was performed using the GENEPOP software (14). Linkage disequilibrium estimates (D and D') and the maximum likelihood estimate of haplotype frequencies were calculated with the software PHASE v.2.1 (15). Estimates of Individual inter-ethnic admixture were carried out by using the software Structure v.2.2 (16). All other statistical analyses were performed by using the statistical software SPSS v.12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Group comparisons for categorical variables were carried out using the χ^2 test, while Student's *t*-test was used for the analysis of continuous variables. Odds ratios (OR) and confidence intervals (95% CIs) were also calculated. Multiple logistic regression analyses were carried out using the backward model. The comparison of ancestry index among the samples was carried out by using the Mann Whitney test. All statistical tests were based on a two-tailed probability, and a *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Inter-ethnic admixture estimates in cancer patients and controls. Figure 1 shows the individual parental ethnic contribution of case and control groups estimated through 48

AIMs. Table I lists the average of ancestries between the investigated groups. Based on individual ancestry estimates, it was possible to estimate the averages of such ancestries among the investigated groups, additionally to testing for differences. We found statistical differences for African and European parental contribution when compared between the cancer and control groups; a higher African contribution was detected in the study group with cancer and, in the control group, a higher European contribution was detected ($p < 0.001$). The Amerindian parental group was not statistically different when compared to ancestral groups. In order to control the substructure effects, we made use of the individual inter-ethnic admixture estimates as interference factors in statistical analyses of association between genetic markers and two investigated tumor types.

NAT2 gene SNPs frequencies associated with cancer susceptibility. Table II describes the frequencies of the five polymorphisms and their respective haplotypes associated with the acetylation profile in the group of patients with cancer. The most frequent allele was 481T, present in 38% of patient samples, while the least frequent was 857A (10%). All polymorphisms of NAT2 gene showed a linkage disequilibrium ($D' > 0.80$; $p \leq 0.05$). Thirteen (13) haplotypes derived from the five investigated polymorphisms were obtained (Table II). The most frequent haplotype found in association with fast acetylation profile was NAT2*4 (26%), followed by NAT2*13 (20%), NAT2*12 (4%) and NAT2*11 (3%). As for xenobiotic slow acetylation haplotypes, the most frequent ones found were: NAT2*5 (37%) and NAT2*7 (10%). The results of the haplotypes generated show a frequency of 53% for the alleles associated with the fast acetylation profile, while 47% were described as slow acetylation profile. Genotypic ratios found were in accordance with those expected by the Hardy Weinberg equilibrium, in all groups analyzed. Estimate relative risks in the groups with cancer (made up by combining GC and BC) were computed in relation to the control group. The results for separately-investigated polymorphisms showed a significant effect for SNP C282T only. Genotypes from the dominant polymorphism C282T (TT+CT) had a significant association ($p < 0.001$; OR=3.076; 95%CI=1.664-5.687) with susceptibility to the different forms of cancer investigated. Separate analysis of the polymorphisms in NAT2 gene showed that four SNPs (C481T, A803G, G857A and T341C) were not important in the association with the susceptibility to cancer.

NAT2 genotype associated with cancer susceptibility. Table III shows the distribution of participants according to the characteristics of the haplotypes and their acetylation profiles. For classification purpose, three genotype groups were defined: i) fast genotype, including these with two fast acetylation alleles; ii) intermediate genotype, with one fast

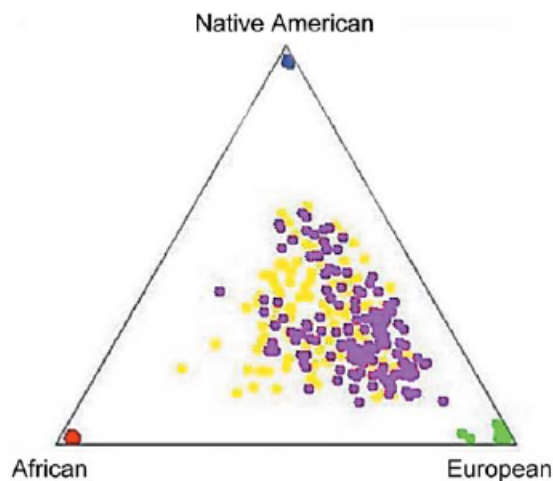


Figure 1. Individual estimate of inter-ethnic admixture between case and control groups. European, African and Native American ancestries were estimated with the genotyping of the panel of 48 ancestry-informative markers in the groups of patients with cancer (magenta) and controls (yellow). The admixture is estimated by a comparison with subjects from the parental populations: European (green), African (red) and Native American (blue).

acetylation allele and one slow acetylation allele; iii) slow genotype, with two slow acetylation alleles. Genotype *NAT2* *5/*5 was the most predominant (58%) among genotypes for slow acetylation identified in the study group with cancer. A significant association of slow and fast acetylation profile with the susceptibility to develop neoplasias investigated was detected ($p=0.010$; $OR=3.054$; $95\%CI=1.303-7.159$) and ($p=0.041$; $OR=0.527$; $95\%CI=0.280-0.973$). We showed that individuals with a slow acetylator profile have increased odds of developing neoplasias, up to three times when compared to controls. In this context, we also established that individuals who are homozygotes for fast acetylation have 53% protection against the development of a tumor (GC and BC) compared to those with other genotypes.

Discussion

The Brazilian population is one of the most heterogeneous population worldwide, with a contribution from three parental groups: Amerindians, Europeans and Africans (13, 17). Therefore, in studies of genetic association to diseases, the addition of a population structure estimate is of great importance aiming at identifying and correcting possible effects of the population substructure (13). In order to avoid spurious interpretations resulting from the population substructure, we used a panel with 48 AIMs (13). This panel has already been used in other studies of genetic association with diseases (18-21). A higher African contribution was

Table I. Ancestry statistics for patients with cancer and controls.

Ancestry	Control (n=89)	Cancer (n=133)	p-Value ^b
Native American	0.28±0.11	0.30±0.12	0.171
European	0.52±0.12	0.44±0.14	<0.001
African	0.20±0.01	0.26±0.11	<0.001

Data are means±standard deviation for quantitative data. ^aPatients with two different forms of neoplasia: gastric and breast cancer. ^bMann Whitney test.

detected in the study group with cancer. Kittles *et al.* found a similar population substructure among African Americans for prostate cancer (22). The genomic control by ancestry is able to correct distortions in the analysis of association as evidenced in other work (23, 24). The important role of control genomic ancestry in association studies is clear especially in populations with a high degree of mixing between ethnic groups, such as the Brazilian population. Our results on the association of the *NAT2* gene SNPs with the risk of different forms of cancer investigated suffered no distortion with the use of genomic ancestry. Several studies have revealed the role of genomic ancestry as a risk factor associated with different types of cancer (25-26). A meta-analysis published by Ali *et al.* found strong evidence that specific types of tumors are more prevalent in certain ethnic groups (27). In these studies, five different SNPs were identified through the sequencing of *NAT2* gene (T341C, C481T, A803G, C282T, G857A), which are some of the most important polymorphisms for determining the enzyme's acetylation speed (28, 29). Our study found similar results to association of diseases in the Brazilian population and in the Northern part of the country, which also investigated the *NAT2* gene which found a high frequency of C481T polymorphism (35% and 38%) and low frequency of G857A (4% and 9%) (28,30). The most frequent haplotype found in association with the fast acetylation profile was *NAT2**4 (26%), followed by *NAT2**13(20%), *NAT2**12 (4%) and *NAT2**11 (3%). This higher frequency for the fast acetylation haplotype *NAT2**4 is similar to with another study developed within the same population (19%) (30). In our study, for slow acetylation haplotypes, the most frequent SNP was *NAT2**5 (37%). A study which investigated a Brazilian population found a frequency of 33% for *NAT2**5 and in that study, the authors suggest an association of this haplotype's high incidence with the influence from European and African ancestral groups in the ethnic composition of the Brazilian population, considering the high incidence of *NAT2**5 in these two parental populations (17, 29). In that study, the isolated analysis of the polymorphisms in *NAT2* gene showed that only the SNP C282T was important in the association with the susceptibility to cancer. There is no consensus in the literature concerning the individual contribution of C282T

Table II. Single-nucleotide polymorphisms of *N*-acetyltransferase 2 gene and haplotypes in patients with cancer from the North region of Brazil.

Nucleotide	282 T	481 T	803 G	857 A	341 C		
Amino acid	None	None	K268R	G286E	I114T		
Frequency	0.30	0.38	0.27	0.10	0.37		
Haplotype	C282T	C481T	A803G	G857A	T341C	Frequency	Phenotype
NAT2*4	C	C	A	G	T	0.2556	Fast
NAT2*5A	.	T	.	.	C	0.1278	Slow
NAT2*5B	.	T	G	.	C	0.2181	Slow
NAT2*5C	.	.	G	.	C	0.0113	Slow
NAT2*5D	C	0.0113	Slow
NAT2*7A	.	.	.	A	.	0.0113	Slow
NAT2*7B	T	.	.	A	.	0.0865	Slow
NAT2*7C	T	.	G	A	.	0.0037	Slow
NAT2*11A	.	T	.	.	.	0.0301	Fast
NAT2*12A	.	.	G	.	.	0.0263	Fast
NAT2*12B	T	.	G	.	.	0.0113	Fast
NAT2*12C	.	T	G	.	.	0.0037	Fast
NAT2*13A	T	0.2030	Fast

^aPatients with two different forms of neoplasia: gastric and breast cancer.

polymorphism to the genetic susceptibility to cancer; however, this is the most important SNP in the definition of haplotype NAT2*13, which characterizes the fast acetylation profile and which, in turn, is well-described in the literature to be associated with risk for cancer (31-33). Major SNPs used in the definition of the acetylation profile have already been described with high frequencies in different ethnic groups. Within the Brazilian population the C282T SNP was found at a significantly higher frequency in European descendants (17), and haplotype NAT2*13 was associated with higher contribution from African ancestry (29,34). These parental populations were particularly significant in our study of comparing the groups of cancer patients and controls.

Different studies involving susceptibility to BC obtained similar results, with greater predominance of fast acetylators (29%) in patients (35). On the other hand, another study with BC found higher frequency of slow acetylators 57% (36). The genotype NAT2*5/5 was the most predominant (58%) among genotypes for slow acetylation identified in the study group with cancer; in the literature, similar results were found concerning slow acetylation profile (17, 29, 30). We showed that individuals with a slow acetylator profile have probability of developing neoplasia (GC and BC) increased to up to three times when compared to controls ($p=0.010$; OR=3.054). The findings of several authors were similar to ours for the association of a slow acetylator profile with the risk of developing GC (37, 38) and BC (39-41), separately.

NAT2 is predominantly expressed in the liver, gastrointestinal tract and colon; although mRNA is detected in several other tissues at basal levels (8, 42). The metabolic profile of the enzyme can be associated with the susceptibility

to several tumors types in different organs, depending on the expression variation of the enzyme in such organ (43). Hein *et al.* published a review mentioning molecular studies of NAT2 gene in association with different forms of neoplasia (43). In their work, the influence of the acetylation profile variation on the increase of the risk of developing several types of tumor is clear. Moore *et al.* carried out a global meta-analysis and showed the great influence of a slow acetylation profile on bladder cancer (44).

Our findings strengthen studies which associate the slow acetylation profile with susceptibility to different forms of cancers lung (45), breast (40, 41), bladder (46, 47), cervical (48), gastric (37, 38), head and neck (43) and prostate (43). In the literature, much is discussed about the role of NAT acetylator profile in carcinogenesis. The metabolic role of the enzyme, such as N- and O-acetylation, can be modulated by SNPs, mainly, which will change the speed of metabolism of potentially carcinogenic agents (32, 49, 50). Another predominant and modulating factor of the risk of developing cancer is the type of exposure of individuals or populations, such as to heterocyclic and aromatic amines, resulting from several lifestyle habits, mainly including cigarette smoking, ingestion of well-done meat and alcohol (50-52). In this study, it was not possible to collect data concerning exposure to carcinogenic agents for the control group. The use of a panel of 48 AIMs allowed us to estimate the individual and global ratios of ancestral population contributions in the case and control samples. Ancestry genomic control was effectively important for this investigation once significant differences were found concerning ethnicity among those with and without neoplasias; based on such estimates, it was possible

Table III. Characterization of *N*-acetyltransferase 2 genotype and preliminary definition of the acetylation profile of patients with cancer^a and controls.

Genotype NAT2	Total (n=222) (%)	Controls (n=89) (%)	Cancer ^a (n=133) (%)	<i>p</i> -Value ^b	OR (95% IC) ^b		
No allele for slow acetylation	76 (34.2)	38 (41.6)	38 (28.6)	0.041	0.527 (0.280-0.973)		
*4/*4	18 (23.7)	9 (23.7)	9 (23.7)				
*11/*4	3 (4.0)	0	3 (7.9)				
*11/*11	1 (1.3)	1 (2.6)	0				
*11/*12	1 (1.3)	0	1 (2.6)				
*11/*13	2 (2.6)	0	2 (5.3)				
*12/*12	5 (6.6)	5 (13.2)	0				
*12/*4	9 (11.8)	5 (13.2)	4 (10.5)				
*12/*13	2 (2.6)	0	2 (5.3)				
*13/*13	8 (10.6)	6 (15.8)	2 (5.3)				
*13/*4	27 (35.5)	12 (31.5)	15 (39.4)				
One allele for slow acetylation	106 (47.8)	42 (48.3)	64 (48.1)			0.922	0.971 (0.540-1.747)
*4/*5	46 (43.4)	25 (59.4)	21 (32.8)				
*4/*7	7 (6.6)	2 (4.8)	5 (7.8)				
*5/*11	3 (2.8)	1 (2.4)	2 (3.1)				
*5/*12	4 (3.8)	2 (4.8)	2 (3.1)				
*5/*13	33 (31.1)	8 (19.0)	25 (39.1)				
*7/*12	4 (3.8)	2 (4.8)	2 (3.1)				
*7/*13	9 (8.5)	2 (4.8)	7 (11.0)				
Two alleles for slow acetylation	40 (18.0)	9 (10.1)	31 (23.3)	0.010	3.054 (1.303 -7.159)		
*5/*5	24 (60.0)	6 (66.7)	18 (58.1)				
*5/*7	15 (37.5)	3 (33.3)	12 (38.7)				
*7/*7	1 (2.5)	0	1 (3.2)				

^aPatients with two different forms of neoplasia: gastric and breast cancer. ^b*p* value and odds ratio (OR) adjusted by ancestry.

to control the ancestry effect on the association of *NAT2* gene with susceptibility to cancer. This is the first study to be carried out in the North region of Brazil, which examined the effect of population substructure associated with the susceptibility to neoplasia. Only the C282T polymorphism was importantly associated with the neoplasias studied. In this study, the strong influence of a slow acetylation profile on the susceptibility to GC and BC was clearly shown.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação Amazônia Paraense do Estado do Pará (FAPESPA); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará. We would like to thank Dayse Oliveira de Alencar for her technical help.

References

- Parkin DM: Cancers attributable to dietary factors in the UK in 2010. *IV Salt. Brit J Cancer* 105: S73-S76, 2011.
- World Health Organization (WHO): World Cancer Report 2008. Lyon, France, 2009.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA): Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
- Boccia S, Sayed-Tabatabaei FA, Persiani R, Gianfagna F, Rauseri S, Arzani D, La Greca A, D'Ugo D, La Torre G, Van Duijn CM and Ricciardi G: Polymorphisms in metabolic genes, their combination and interaction with tobacco smoke and alcohol consumption and risk of gastric cancer: A case-control study in an Italian population. *BMC Cancer* 7: 206, 2007.
- Vineis P: The relationship between polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Toxicology* 181-182: 457-462, 2002.
- Taioli E: Gene-environment interaction in tobacco-related cancers. *Carcinogenesis* 29: 1467-1474, 2008.
- Zhang J, Qiu LX, Wang ZH, Wang JL, He SS and Hu XC: *NAT2* polymorphisms combining with smoking associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 123: 877-883, 2010.
- Hein DW: *N*-Acetyltransferase single nucleotide polymorphisms: Emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5: 353-366, 2009.
- Eichholzer M, Rohmann S, Barbir A, Hermann S, Teucher B, Kaaks R and Linseisen J: Polymorphisms in heterocyclic aromatic amines metabolism-related genes are associated with colorectal adenoma risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3: 96-106, 2012.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1626, 1989.

- 11 Rozen S and Skaletsky HJ: Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Krawetz S and Misener (eds.). Totowa. Humana Press, pp. 365-386, 2000.
- 12 The Consensus Gene Nomenclature of Human *NAT2* Alleles [http://louisville.edu/medschool/pharmacology/consensus-human-arylamine-N-acetyltransferase-gene-nomenclature/nat_pdf_files/Human_NAT2_alleles.pdf].
- 13 Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guereiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH and Santos SE: Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 insertion-deletion (INSEL) ancestry informative markers (AIM) panel. *Hum Mutat* 31: 184-190, 2009.
- 14 Rousset F: Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8: 103-106, 2008.
- 15 Stephens M, Smith NJ and Donnelly P: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978-989, 2001.
- 16 Software for Genetic Analysis Structure v. 2.2 [<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>].
- 17 Teixeira RLF, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQ, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, Melo HM, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN and Santos AR: Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutat Res* 62: 31-30, 2007.
- 18 Bakos RM, Besch R, Zoratto GG, Godinho JM, Mazzotti NG, Ruzicka T, Bakos L, Santos SE, Ashton-Prolla P, Berking C and Giugliani R: The *CDKN2A* p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Exp Dermatol* 20: 890-893, 2011.
- 19 Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DRT, Costa DC, Furlani NG, Zuccherato LW, Machado M, Reid ME, Zalis MG, Rossit AR, Santos SEB, Machado RL and Lustigman S: Population genetics of GYPB and association study between GYPB*S/s polymorphism and susceptibility to *P. falciparum* infection in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE* 6: 16123, 2011.
- 20 Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, Oliveira LF, Henderson BL, Castro AP, Maia MH, Barbosa FB, Santos SE, Guerreiro JF, Sena L and Santos EJ: Systemic lupus erythematosus: Association with *KIR* and *SLC11A1* polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus* 20: 265-273, 2011.
- 21 Friedrich DC, Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC and Hutz MH: Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed Brazilian population. *PLoS ONE* 7: 46520, 2012.
- 22 Kittles RA, Chen W, Panguluri RK, Ahaghotu C, Jackson A, Adebamowo CA, Griffin R, Williams T, Ukoli F, Adams-Campbell L, Kwagyan J, Isaacs W, Freeman V and Dunston GM: *CYP3A4-V* and prostate cancer in African Americans: Causal or confounding association because of population stratification? *Hum Genet* 110: 553-560, 2002.
- 23 Wang X, Zhu X, Qin H, Cooper RS, Ewens WJ, Li C and Li M: Adjustment for local ancestry in genetic association analysis of admixed populations. *Bioinformatics* 27: 670-677, 2011.
- 24 Shriner D, Adeyemo A, Ramos E, Chen G and Rotimi CN: Mapping of disease associated variants in admixed populations. *Genome Biol* 12: 223, 2011.
- 25 Pereira L, Zamudio R, Soares-Souza G, Herrera P, Cabrera L, Hooper CC, Cok J, Combe JM, Vargas G, Prado WA, Schneider S, Kehdy F, Rodrigues MR, Chanock SJ, Berg DE, Gilman RH and Tarazona-Santos E: Socioeconomic and nutritional factors account for the association of gastric cancer with Amerindian ancestry in a Latin American admixed population. *PLoS One* 7: 41200, 2012.
- 26 Kupfer SS, Anderson JR, Hooker S, Skol A, Kittles RA, Keku TO, Sandler RS and Ellis NA: Genetic heterogeneity in colorectal cancer associations between African and European Americans. *Gastroenterology* 139: 1677-1685, 2010.
- 27 Ali R, Barnes I, Cairns BJ, Finlayson AE, Bhala N, Mallath M and Beral V: Incidence of gastrointestinal cancers by ethnic group in England, 2001-2007. *Gut* [Epub ahead of print], 2012.
- 28 Teixeira RL, Silva FP Jr, Silveira AR, Cabello PH, Mendonça-Lima L, Rabahi MF, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, de Miranda AB and Santos AR: Sequence analysis of *NAT2* gene in Brazilians: identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. *Mutat Res* 683: 43-49, 2010.
- 29 Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R and Poloni ES: Worldwide distribution of *NAT2* diversity: Implications for *NAT2* evolutionary history. *BMC Genet* 9: 21, 2008.
- 30 Santos NP, Jacques SM, Santos AK, Silva CA, Vallinoto AC, Fernandes DC, Carvalho DC, Santos, SE and Hutz MH: N-Acetyl transferase 2 and cytochrome *P450 2E1* genes and isoniazid-induced hepatotoxicity in Brazilian patients. *Tuberc Lung Dis* 17: 499-504, 2013.
- 31 He LJ, Yu YM, Qiao F, Liu JS, Sun XF and Jiang LL: Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 2 and colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol* 11: 4268-4271, 2005.
- 32 Hong SH, Kim JW, Kim HG, Park IK, Ryoo JW, Lee CH, Sohn YK and Lee JY: Glutathione S-transferase (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) and N-acetyltransferase 2 polymorphisms and the risk of gastric cancer. *J Prev Med Public Health* 39: 135-140, 2006.
- 33 Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P and Hatagima A: Influence of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM3* and *NAT2* genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: Results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol* 42: 632-637, 2006.
- 34 Sabbagh A, Darlu P, Crouau-Roy B and Poloni ES: Arylamine N-Acetyltransferase 2 (*NAT2*) genetic diversity and traditional subsistence: A Worldwide population survey. *PLoS ONE* 6: 18507, 2011.
- 35 Ochs-balcom HM, Wiesner G and Elston RC: A meta-analysis of the association of N-acetyltransferase 2 gene (*NAT2*) variants with breast cancer. *Am J Epidemiol* 166: 246-254, 2007.
- 36 Sillanpaa P, Hirvonen A, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Uusitupa M, Vainio H and Mitrunen K: *NAT2* slow acetylator genotype as an important modifier of breast cancer risk. *Int J Cancer* 114: 579-584, 2005.
- 37 Malik MA, Upadhyay R, Modi DR, Zargar SA and Mittal B: Association of *NAT2* gene polymorphisms with susceptibility to esophageal and gastric cancers in the Kashmir Valley. *Arch Med Res* 40: 416-23, 2009.

- 38 Zhang YW, Eom SY, Kim YD, Song YJ, Yun HY, Park JS, Youn SJ, Kim BS, Kim H and Hein DW: Effects of dietary factors and the *NAT2* Acetylator status on gastric cancer in Koreans. *Int J Cancer* 125: 139-145, 2009.
- 39 Khedhaier A, Hassen A, Bouaouina N, Gabbouj S, Ahmed SB and Chouchane L: Implication of xenobiotic metabolizing enzyme gene (*CYP2E1*, *CYP2C19*, *mEH* and *NAT2*) polymorphisms in breast carcinoma. *BMC Cancer* 8: 109, 2008.
- 40 Baumgartner KB, Schlierf TJ, Yang D, Doll MA and Hein DW: *N*-Acetyltransferase 2 genotype modification of active cigarette smoking on breast cancer Risk among hispanic and non-hispanic white women. *Toxicol Sci* 112: 211-220, 2009.
- 41 Conlon MSC, Johnson KC, Bewick MA, Lafrenie RM and Donner A: Smoking (active and passive), *N*-acetyltransferase 2, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol* 34: 142-149, 2010.
- 42 Daly A, Cholerton S, Armstrong M and Idle JR: Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect* 102: 55-61, 1994.
- 43 Hein DW, Doll MA and Fretland AJ: Molecular genetics and epidemiology of the *NAT1* and *NAT2* Acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 29-42, 2000.
- 44 Moore LE, Baris DR, Figueroa JD, Garcia-Closas M, Karagas MR, Schwenn MR, Johnson AT, Lubin JH, Hein DW, Dagnall CL, Colt JS, Kida M, Jones MA, Schned AR, Cherala SS, Chanock SJ, Cantor KP, Silverman DT and Rothman N: *GSTM1* null and *NAT2* slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and *NAT2* meta-analysis. *Carcinogenesis* 32: 182-189, 2010.
- 45 Lee M, Su L and Christiani DC: Synergistic effects of *NAT2* slow and *GSTM1* null genotypes on carcinogen DNA Damage in the lung. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 1492-1497, 2010.
- 46 Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR and Peters U: Genetic susceptibility to cancer. The role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA* 299: 2423-2434, 2008.
- 47 García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castañó-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real FX and Rothman N: *NAT2* slow acetylation, *GSTM1* null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 366: 649-59, 2005.
- 48 Costa S, Medeiros R, Vasconcelos A, Pinto D and Lopes C: A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 678-82, 2002.
- 49 Hein DW, Leff MA, Ishibe N, Sinha R, Frazier HA, Doll MA, Xiao GH, Weinrich MC and Caporaso NE: Association of prostate cancer with rapid *N*-acetyltransferase 1 (*NAT1*10*) in combination with slow *N*-acetyltransferase 2 acetylator genotypes in a pilot case-control study. *Environ Mol Mutagen* 40: 161-167, 2002.
- 50 Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC and Hein DW: Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human *N*-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis* 8: 1665-1671, 2007.
- 51 Costa S, Pinto D, Morais A, Vasconcelos A, Oliveira J, Lopes C and Medeiros R: Acetylation genotype and the genetic susceptibility to prostate cancer in a Southern European population. *Prostate* 64: 246-252, 2005.
- 52 Weber BL and Nathanson KL: Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer* 36: 1193-1199, 2000.

Received July 4, 2013

Revised July 19, 2013

Accepted July 22, 2013

CAPÍTULO IV
DISCUSSÃO GERAL

Discussões referentes aos resultados específicos obtidos no presente trabalho encontram-se na seção anterior de Resultados. Nessa seção serão abordados aspectos gerais, referentes à aplicabilidade da investigação de marcadores moleculares envolvidos na Susceptibilidade ao Câncer, principalmente no Brasil.

A Susceptibilidade Genética ao Câncer está direcionada para estudar a herdabilidade genética de variações em genes envolvidos na susceptibilidade, e os efeitos dessa variação no risco de desenvolvimento de câncer para um indivíduo. Dessa forma, a identificação de marcadores genéticos que possam prever o risco ao desenvolvimento de neoplasias para um indivíduo, pode auxiliar no diagnóstico precoce e controle de fatores de risco específicos, para reduzir os riscos adicionais.

O objetivo da presente dissertação foi: verificar uma possível associação entre os SNPs do gene *NAT2* e a susceptibilidade ao acometimento de Câncer gástrico e de mama em pacientes da região norte do Brasil.

Em estudos de susceptibilidade ao câncer, uma série de associações ao genoma tem sido realizados e vários SNPs que podem modificar o risco a neoplasia foram detectados com sucesso (Ulrich *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2008). Avanços tecnológicos recentes têm aumentado a velocidade de genotipagem e reduzido seus custos, proporcionando um aumento no número de estudos investigativos de associações entre variantes em genes candidatos e o risco de desenvolvimento do câncer (Dong *et al.*, 2008).

No presente trabalho, individualmente somente o polimorfismo C282T do gene *NAT2* foi relevante para associação com as neoplasias investigadas. Outro aspecto importante foi a forte evidência de influência do perfil de lenta acetilação de xenobióticos do gene *NAT2* na susceptibilidade ao Câncer Gástrico e de Mama. Este é o primeiro estudo, na região Norte do Brasil, que realizou e corrigiu o efeito da subestruturação populacional associado à susceptibilidade de neoplasias.

IV.1 Estimativa de mistura interétnica em pacientes com câncer e controles

A população brasileira é uma das mais heterogêneas em todo o mundo, a qual possui contribuição de três grupos parentais Ameríndios, Europeus e Africanos (Teixeira *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009). Além dos grupos formadores originais do período colonial, o Brasil recebeu nos séculos XIX e XX imigrantes de várias partes do mundo (Salzano e Bortolini, 2002). Nesse ponto, a aplicabilidade da

Susceptibilidade no Brasil torna-se diferenciada, pois os modelos de estudos atuais não são aplicáveis às populações com alto grau de miscigenação (Suarez-Kurtz, 2007).

Dependendo da região geográfica do Brasil, o processo de miscigenação entre as três subpopulações ancestrais ocorreu de forma muito diferenciada. É praticamente consenso entre pesquisadores que em todo o território brasileiro a contribuição de genes (autossômicos) europeus é maior do que a dos outros grupos étnicos. Também é aceito comumente que a contribuição de genes ameríndios é maior nas populações da região Norte e que a de genes africanos é maior na região Nordeste e que no Sul do país a contribuição de genes europeus é a mais elevada (Callegari-Jacques *et al.*, 2003).

Em investigações do tipo caso-controle, os resultados podem ser mal interpretados em função da existência de uma estratificação populacional não identificada, entre os dois grupos investigados (Pritchard e Rosenberg, 1999). Esse fato é particularmente importante quando as investigações são realizadas em populações miscigenadas, em um passado relativamente recentemente (como é o caso do processo de formação da maioria da população brasileira). Logo, controlar o efeito da etnicidade é importante, principalmente em populações que historicamente apresentam elevados graus de mistura interétnica, como a amostra investigada. Diferentes trabalhos na literatura especializada tem realizado o controle genômico em estudos de associação caso-controle (Stefansson *et al.*, 2009; Fernandez-Rozadilla *et al.*, 2012).

Com o intuito de solucionar esse problema, no presente trabalho foi aplicado um conjunto de 48 marcadores bialélicos, informativos de ancestralidade para serem utilizados como controle genômico em estudos de associação.

O painel de 48 marcadores de ancestralidade utilizado no presente estudo foi capaz de detectar diferenças individuais de ancestralidade para os grupos de pacientes com e sem Câncer. A metodologia de controle genômico empregado neste estudo foi anteriormente utilizada com sucesso em outras publicações do grupo (Bakos *et al.*, 2011; Tarazona-Santos *et al.*, 2011; Pedroza *et al.*, 2011; Friedrich *et al.*, 2012).

Com base nas estimativas individuais de ancestralidade foi possível estimar as médias destas ancestralidades entre os grupos investigados e testar as diferenças. Encontramos diferenças estatísticas para a contribuição parental Africana

e Européia quando comparadas entre os grupos com Câncer e Controles, sendo que o componente europeu era significativamente maior no grupo controle do estudo quando comparado ao grupo de pacientes com câncer. Com relação a média da ancestralidade africana foi observada uma estimativa inversa, onde este componente parental por sua vez era significativamente maior no grupo de pacientes com Câncer. O grupo parental ameríndio não apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos ancestrais.

Embora neste estudo tenham sido analisados 222 indivíduos, uma população maior precisa ser investigada para elucidar a influência que o componente étnico tem sobre o desenvolvimento do Câncer Gástrico e de Mama.

Para controlar os possíveis efeitos da subestruturação, empregamos as estimativas de mistura interétnica individuais como fatores de interferência em todas as análises estatísticas de associações entre os marcadores genéticos de susceptibilidade relacionados ao desenvolvimento neoplásico dos dois tipos tumorais investigados.

O controle genômico foi uma ferramenta importante no desenho e interpretação dos nossos dados para corrigir o efeito da subestruturação populacional que é particularmente importante no nosso país pela elevada mistura interétnica (Kittles *et al.*, 2002).

IV.2 Frequências dos SNPs no gene *NAT2* associados com a susceptibilidade ao câncer

Nos grupos de indivíduos controles do estudo e pacientes com Câncer, foram identificados cinco diferentes SNPs no gene *NAT2* (T341C, C481T, A803G, C282T e G857A) sendo estes alguns dos polimorfismos mais importantes para a determinação da velocidade de acetilação da enzima (Teixeira *et al.*, 2010; Sabbagh *et al.*, 2008). Diferentes estudos realizados de associação com doenças, na população Brasileira e na Região Norte do país, que também investigaram o gene *NAT2* obtiveram resultados semelhantes ao nosso, com alta frequência do polimorfismo C481T (35% e 38%) e baixa do G857A (4% e 9%) (Teixeira *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013).

O haplótipo mais frequente encontrado associado ao perfil de acetilação rápida foi *NAT2**4 (26%), seguido por *NAT2**13(20%), *NAT2**12 (4%) e *NAT2**11 (3%). O resultado do haplótipo de rápida acetilação *NAT2**4 apresentou similaridade

com outro trabalho desenvolvido na mesma população (frequência de 19%) (Santos *et al.*, 2013).

Com relação aos haplótipos de lenta acetilação de xenobióticos, os mais frequentes encontrados foram: *NAT2*5* (37%) e *NAT2*7* (10%). Um estudo realizado na população brasileira encontrou 33% de frequência de *NAT2*5* e uma sugestão da associação de alta incidência deste haplótipo com a influência dos grupos ancestrais europeu e africano na composição étnica da população brasileira, considerando a alta incidência do *NAT2*5* nestas duas populações parentais (Teixeira *et al.*, 2007; Sabbagh *et al.*, 2008).

Os resultados dos haplótipos obtidos evidenciam uma frequência de 53% para os alelos associados ao perfil de acetilação rápida de xenobióticos, enquanto que 47% foram descritos com o perfil de acetilação lenta. Dois estudos realizados com associação de doenças encontraram resultados divergentes ao nosso com maior frequência do perfil de acetilação lenta de 53% e 57% (Santos *et al.*, 2013; Sillanpaa *et al.*, 2005).

Os resultados dos polimorfismos individualmente investigados demonstraram um efeito significativo apenas para o SNP C282T. Não existe um consenso na literatura, quanto à contribuição individual do polimorfismo C282T na susceptibilidade genética ao câncer, porém este é o SNP mais importante na definição do haplótipo *NAT2*13A*, que caracteriza o perfil de acetilação rápida, este sim por sua vez está bem descrito na literatura em associação ao risco de câncer (He *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2006).

Os principais SNPs utilizados na definição do perfil de acetilação já foram descritos com frequências elevadas em grupos étnicos distintos, na população brasileira, o SNP 282C>T foi encontrado em frequências significativamente mais elevadas em descendentes Europeus (Teixeira *et al.*, 2007) e o haplótipo *NAT2*13* foi associado a maior contribuição de ancestralidade Africana (Sabbagh *et al.*, 2008; Sabbagh *et al.*, 2011). Estas populações parentais são especialmente as que se revelaram significantes em nosso estudo na comparação dos grupos de pacientes com câncer e controles.

IV.3 Genótipos do gene *NAT2* associados com a susceptibilidade ao câncer

Diferentes estudos envolvendo a susceptibilidade ao Câncer de Mama

encontraram resultados similares aos nossos com maior prevalência de acetiladores rápidos nos pacientes (Ochs-Balcom *et al.*, 2007).

Nossos resultados evidenciam que o genótipo *NAT2**5/*5 foi o mais prevalente (58%) entre os pacientes com Câncer para o perfil de acetilação lenta, concordando com outras investigações na literatura (Teixeira *et al.*, 2007; Sabbagh *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2013). Vários autores tiveram achados semelhantes ao nosso com a associação do perfil acetilador lento de xenobióticos ao risco no desenvolvimento de Câncer Gástrico (Malik *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009) e de Câncer de Mama separadamente (Khedhaier *et al.*, 2008; Baumgartner *et al.*, 2009; Conlon *et al.*, 2010).

A enzima *NAT2* é predominantemente expressa no fígado, trato gastrointestinal e colon; apesar de mRNA ser detectado em vários outros tecidos em níveis basais, portanto é razoável supor que exista uma correlação com níveis de expressão da enzima *NAT2* e os órgãos afetados primariamente pelas neoplasias (Hein *et al.*, 2009; Daly *et al.*, 1994).

Hein e colaboradores (2000) publicaram uma revisão da literatura envolvendo estudos moleculares do gene *NAT2* em associação com diferentes formas de neoplasias, neste trabalho fica claro a influência da variação do perfil de acetilação no aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos tumorais (Hein *et al.*, 2000).

Moore e colaboradores (2010) realizaram uma meta-análise global na qual demonstraram a grande influência do perfil de lenta acetilação de xenobióticos com câncer de bexiga (Moore *et al.*, 2010). Outros estudos reforçam nossos achados, com associação do perfil de lenta acetilação a susceptibilidade a diferentes formas de câncer: Pulmão (Lee *et al.*, 2010), Mama (Baumgartner *et al.*, 2009; Conlon *et al.*, 2010), Bexiga (Dong *et al.*, 2008; García-Closas *et al.*, 2005), Colo do útero (Costa *et al.*, 2002b), Gástrico (Malik *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), Cabeça e pescoço e Próstata (Hein *et al.*, 2000). Outros estudos, no entanto, discordam dos nossos resultados e associam o risco do perfil acetilador rápido na susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias (He *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2006; Le Marchand *et al.*, 2001; Ladero *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2006).

O perfil de metabolização da enzima pode ser ainda associado à susceptibilidade de vários tumores em diferentes órgãos, dependendo da variação na expressão da enzima neste órgão (Hein *et al.*, 2000).

Na literatura muito se discute sobre o papel do perfil acetilador da enzima N-

acetiltransferase na carcinogênese. A função de metabolização da enzima, como N- e O-acetilação, podem ser moduladas pela ocorrência de polimorfismos genéticos, principalmente SNPs, que irão alterar a velocidade de metabolização dos agentes potencialmente carcinogênicos (He *et al.*, 2005; Hein *et al.*, 2002; Zang *et al.*, 2007). Outro fator preponderante e modulador do risco de desenvolvimento do câncer é o tipo de exposição ao qual o indivíduo ou população são expostos, tais como: aminas heterocíclicas e aromáticas, provenientes de vários hábitos de estilo de vida, incluindo principalmente o fumo de cigarro, ingestão de carne bem cozida e de álcool (Zang *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2005; Weber and Nathanson, 2000).

Um trabalho desenvolvido por Ikeda e colaboradores (2008) realizou um estudo de associação completa do genoma (GWAs) identificando 214 SNPs em 44 genes importantes para carcinogênese gástrica, entre eles o gene *NAT2* apresentava um importante papel no mecanismo neoplásico. Apesar do gene *NAT2* não fazer parte das classes de Genes supressores tumorais (GSTs) e Oncogenes, que são classicamente os genes mais estudados para o desenvolvimento neoplásico, a ocorrência de variações genéticas no gene *NAT2* tem se revelado importantes moduladores de risco a indivíduos expostos a xenobióticos (Fuselli *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Zang *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2008; Walraven *et al.*, 2008).

A investigação no gene *NAT2* faz parte de um projeto mais amplo de criação e validação de um painel de marcadores moleculares de rastreamento de populações com alto risco ao desenvolvimento de neoplasias, destinado a utilização na prática clínica da rede pública de saúde - SUS. O painel de marcadores genéticos tem como objetivo fornecer aos pacientes e profissionais de saúde pública informações a respeito do diagnóstico precoce do câncer.

A aplicação do painel de marcadores nas populações pode promover a redução de custos ao SUS devido a detecção precoce do câncer, benefício este que evita grandes custos associados a internações e tratamentos das neoplasias, frequentemente de alto custo. Além dos aspectos econômicos, a aplicação do painel de marcadores genéticos de susceptibilidade apresentam vantagens aos pacientes por ser uma metodologia não invasiva e promover na maioria dos casos o aumento de sobrevida dos pacientes com neoplasias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves MK *et al.* (2010) CDKN2A promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with *Helicobacter pylori* flaA(+) strains in gastric adenocarcinomas. *APMIS*, 118(4), 297-307.
- Almeida JRC *et al.* (2007) Marcadores Tumoriais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 305-316.
- Alberg AJ, Daudt A, Huang H-Y (2004) N-acetyltransferase 2 (NAT2) genotypes, cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Câncer detection and prevention*, 28, 187-193.
- Agúndez JAG, Martinez C, Oliveira M (1998) Expression in human prostate of drug and carcinogen-metabolising enzymes: association with prostate cancer risk. *British Journal Cancer* 78:1361-1367.
- Aspinall PJ (1998) Describing the “White” ethnic group and its composition in medical research. *Soc Sci Med* 47: 1797-1808.
- Assumpção PP and Burbano RR (2005) Genética e câncer gástrico. In: Linhares E, Lourenço L, Sano T (eds.) *Atualização em câncer gástrico*. Tecmed Editora, São Paulo, pp 95-108.
- Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE (2010) Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 116(11): 1919-23.
- Bakos RM, Besch R, Zoratto GG, Godinho JM, Mazzotti NG, Ruzicka T, Bakos L, Santos SE, Ashton-Prolla P, Berking C, Giugliani R (2011) The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Experimental Dermatology* 20: 890–893.
- Bamshad MJ, Wooding S, Watkins WS, Ostler CT, Batzer MA, Jorde LB (2003) Human population genetic structure and inference of group membership. *Am J Hum Genet* 72: 578-589.
- Baumgartner KB, Schlierf TJ, Yang D, Doll MA, Hein DW (2009) N-acetyltransferase 2 Genotype Modification of Active Cigarette Smoking on Breast Cancer Risk among Hispanic and Non-Hispanic White Women. *Toxicological sciences* 112: 211–220.
- Billack B and Monteiro AN (2005) BRCA1 in breast and ovarian cancer predisposition. *Cancer Lett* 8;227(1):1-7.
- Borlak J and Reamon-Buettner SM (2006) N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in colon and lung cancer patients. *BMC Medical Genetics* 7:58.
- Bowden GT and Fischer SM (1997) Chemical Carcinogens and Anticarcinogens. In: BOWDEN GT. *Comprehensive Toxicology*. 1ª edição. Elsevier Science. Cap.12.
- Briollais L, Durrieu G, Upathilake R (2007) Novel approach for genome scan meta-analysis of rheumatoid arthritis: a kernel-based estimation procedure. *BMC Proc* 1. S96.
- Brockmoller J and Tzvetkov MV (2008) Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *European Journal Clinic Pharmacology*, 64: 133-157.
- Brown LM, Gridley G, Wu AH (2010) Low level alcohol intake, cigarette smoking and risk of breast cancer in Asian-American women. *Breast Cancer Res. Treat.* 120(1): 203-210.
- Calcagno Q, Leal MF, Assumpção PP, Smith MAC, Burbano RR (2008) MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 21; 14(39): 5962-5968.

- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossett SG, Ferreira ME and Hutz MH (2003) Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. *Annuals Journal Human Biology* 15: 824-834.
- Castellsagué E, González S, Guinó E, Stevens KN, Borràs E, Raymond VM, Lázaro C, Blanco I, Gruber SB, Capellá G (2010) Allele-specific expression of APC in adenomatous polyposis families. *Gastroenterology*. 139(2):439-47.
- Chakraborty R, Kamboh MI, Ferrell RE (1991) "Unique" alleles in admixed populations: a strategy for determining hereditary population differences of disease frequencies. *Ethn Dis* 1: 145-155.
- Chang HW, Lee YS, Nam HY, Han M, Kim HJ, Moon SY, Hyesungjeon, Park JJ, Carey TE, Chang SE, Kim SW, Kim SY (2012) Knockdown of β -catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Signal* 29.
- Conlon MSC, Johnson KC, Bewick MA, Lafrenie RM, Donner A (2010) Smoking (active and passive), N-acetyltransferase 2, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology* 34: 142–149.
- Cooper GM (1994) *Elements of Human Cancer*. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 1^a ed.
- Coronado GD, Beasley J, Livaudais J (2011) Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *Salud Publica Mex* 53: 440-447.
- Costa S (2002a) Polimorfismos genéticos da N-acetiltransferase 2 e Susceptibilidade para tumores sólidos. Dissertação de mestrado. Cidade do Porto. Universidade do Porto, 73p.
- Costa S, Medeiros R, Vasconcelos A (2002b) A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*, 128: 678-682.
- Costa S, Pinto D, Morais A, Vasconcelos A, Oliveira J, Lopes C, Medeiros R (2005) Acetylation genotype and the genetic susceptibility to Prostate cancer in a Southern European population. *The Prostate* 64: 246-252.
- Craven RA, Vasudev NS, Banks RE (2012) Proteomics and the search for biomarkers for renal cancer. *Clin Biochem* 7.
- Daly A, Cholerston S, Armstrong M, Idle JR (1994) Genotyping for Polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect* 102: 55-61.
- Delbridge AR, Valente LJ, Strasser A (2012) The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1;4(11).
- Donald PR, Sirgel FA, Venter A (2004) The Influence of Human N-Acetyltransferase Genotype on the Early Bactericidal Activity of Isoniazid. *Clinical Infectious Diseases* 39: 1425-1430.
- Dong LM, Potter JD, White E (2008) Genetic Susceptibility to Cancer. The Role of Polymorphisms in Candidate Genes. *JAMA* 299: 2423-2434.
- Dupret JM and Rodrigues-Lima F (2005) Structure and regulation of the drug-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases. *Curr Med Chem* 12(3): 311-318.
- Eichholzer M, Rohrmann S, Barbir A, Hermann S, Teucher B, Kaaks R (2012) Polymorphisms in heterocyclic aromatic amines metabolism-related genes are associated with colorectal adenoma risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3:96-106.
- Fernandez-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V, Crous-Bou M et al. (2012) Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to

- predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. *The Pharmacogenomics Journal* 1–9.
- Fernandez-Villar A, Sopeña B, Vázquez R (2003) Isoniazid Hepatotoxicity Among Drug Users: The Role of Hepatitis C. *Clinical Infectious Disease* 36: 293-298.
- Ferrasi AC et al. (2010) Helicobacter pylori and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 16(3):312-9.
- Forone N, Jesus-Garcia M, Hakaru T, Freire CAR (2005) *Oncologia: guia de medicina ambulatorial e hospitalar de oncologia*. Editora Manole, Barueri, SP, pp 350.
- Friedrich DC, Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC, Hutz MH (2012) Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. *PLoS ONE*, 7.
- Fuselli S, Gilman RH, Chanock SJ (2007) Analysis of nucleotide diversity of *NAT2* coding region reveals homogeneity across Native American populations and high intra-population diversity. *Pharmacogenomics* 7: 144-152.
- García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real FX, Rothman N (2005) *NAT2* slow acetylation, *GSTM1* null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.*, 366:649-59.
- Gil JP and Lechner MC (1998) Increased frequency of wild-type arylamine-N-acetyltransferase allele *NAT2*4* homozygotes in Portuguese patients with colorectal cancer. *Carcinogenesis* 19 (1): 37-41.
- Grant DM, Blum M, Demierre A (1989) Nucleotide sequence of an intron less gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleic Acids Researches*, 17(10): 3978.
- Guilford P, Hopkins J, Harraway J et al. (1998) E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392: 402-405.
- Hanahan D and Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan D and Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74.
- Hawley S, Fazli L, McKenney JK et al. (2013) A Model for the Design and Construction of a Resource for the Validation of Prognostic Prostate Cancer Biomarkers: The Canary Prostate Cancer Tissue Microarray. *Adv Anat Pathol* 20(1): 39-44.
- He L, Yu Y, Qiao F (2005) Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 2 and colorectal cancer risk. *World J. Gastroenterology* 11(27): 4268-4271.
- Hein DW, Doll MA, Rustan TD (1993) Metabolic activation and desactivation of arylamine carcinogens by recombinant human *NAT1* and polymorphic *NAT2* acetyltransferases. *Carcinogenesis* 14: 1633-1638.
- Hein DW, Rustan TD, Ferguson RJ (1994) Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human *NAT1* and *NAT2* acetyltransferases. *Arch. Toxicol.* 68: 129-133.
- Hein DW, Doll MA, Fretland AJ (2000) Molecular Genetics and Epidemiology of the *NAT1* and *NAT2* Acetylation Polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9: 29-42.
- Hein DW, Leff MA, Ishibe N (2002) Association of prostate cancer with rapid N-acetyltransferase 1 (*NAT1*10*) in combination with slow N-acetyltransferase 2

- acetylator genotypes in a pilot case control study. *Environ. Mol. Mutagen.* 40: 161–167.
- Hein DW (2009) N-acetyltransferase single nucleotide polymorphisms: Emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:353–366.
- Hong SH, Kim JW, Kim HG (2006) Glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and N-acetyltransferase 2 polymorphisms and the risk of Gastric Cancer. *J. Prev. Med. Public Health* 39(2): 135-140.
- Huang YS, Chern HD, Su WJ (2002) Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 35(4): 883-9.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA/ Ministério da Saúde (2011) Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 118 p.
- Ikeda S, Sasazuki S, Natsukawa S (2008) Screening of 214 Single nucleotide polymorphisms in 44 candidate cancer susceptibility genes: A case-control study on gastric and colorectal cancers in the Japanese population. *American journal of gastroenterology* 103: 1476-1487.
- Khedhaier A, Hassen A, Bouaouina N (2008) Implication of xenobiotic metabolising enzyme gene (*CYP2E1*, *CYP2C19*, *mEH* and *NAT2*) polymorphisms in Breast Carcinoma. *BMC Cancer* 8: 109.
- Kita T, Tanigawara Y, Chikazawa S (2001) N-Acetyltransferase 2 Genotype Correlated with Isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients. *Biol. Pharm. Bull.* 24(5): 544-549.
- Kittles RA, Chen W, Panguluri RK et al. (2002) CYP3A4-V and prostate cancer in African Americans: causal or confounding association because of population stratification? *Hum Genet* 110: 553–560.
- Knudson AG (1991) Overview: genes that predispose to cancer. *Mutation Research* 247: 185-190.
- Kwack KB, Song HJ, Pyun JA, Lee KJ, Cho SW (2010) Study on association between an H-RAS gene polymorphism and gastric cancer development. *56(2):121-2.*
- Ladero JM, Agúndez JA, Olivera M, Lozano L, Rodríguez-Lescure A, Diaz-Rubio M, Benítez J (2002) N-acetyltransferase 2 single-nucleotide polymorphisms and risk of gastric carcinoma. *Eur J Clin Pharmacol.*, 58(2):115-8.
- Lauren P (1965) The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal type carcinoma: an attempt at a histo clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64:31-49.
- Le Marchand L, Hankin JH, Wilkens LR, Pierce LM, Franke A, Kolonel LN, Seifried A, Custer LJ, Chang W, Lum-Jones A, Donlon T (2001) Combined effects of well-done red meat, smoking, and rapid N-acetyltransferase 2 and CYP1A2 phenotypes in increasing colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 10:1259-66.
- Leal MF, Chung J, Calcagno DQ, Assumpção PP, Demachki S et al. (2012a) Differential Proteomic Analysis of Noncardia Gastric Cancer from Individuals of Northern Brazil. *PLoS ONE* 7(7).
- Leal MF, Calcagno DQ, Demachki S, Assumpção PP, Chammas R, Burbano RR, Smith MAC (2012b) Clinical implication of 14-3-3 epsilon expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 18(13): 1531-1537.
- Lee M, Su L, Christiani DC (2010) Synergistic Effects of *NAT2* slow and *GSTM1* null

- genotypes on Carcinogen DNA Damage in the Lung. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19(6): 1492–1497.
- Lima VP et al. (2008) H pylori (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. *World J Gastroenterol.* 14:884-91.
- Longuemaux S, Delomenie C, Gallou C (1999) Candidate genetic modifiers of Individual susceptibility to Renal Cell Carcinoma: A study of Polymorphic Human xenobiotic-metabolizing enzymes. *Cancer Research* 59: 2902-2908.
- López-Cima MF, González-Arriaga P, García-Castro L (2007) Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1 and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. *BMC Câncer*, 7: 162-167.
- Louro ID (2002) Genética molecular do câncer. In: ROSSIT A.R.B. e FROES N.D.T.C. *Epidemiologia molecular- Xenobióticos e susceptibilidade genética na etiologia do câncer.* 2ª ed. MSG Produção Editorial. São Paulo. Cap. 3, p. 31-48.
- Malik MA, Upadhyay R, Modi DR, Zargar SA, Mittal B (2009) Association of *NAT2* gene polymorphisms with susceptibility to esophageal and gastric cancers in the Kashmir Valley. *Arch Med Res* 40: 416-23.
- Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ (2006) Influence of CYP1A1, CYP2E1, *GSTM3* and *NAT2* genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: Results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral oncology*, 42: 632-637.
- Martin AM and Weber BL (2000) Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *Journal National Cancer Institute*, 92: 1126-1135.
- Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D (2012) New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 15.
- Moore LE, Baris DR, Figueroa JD, Garcia-Closas M, Karagas MR, Schwenn MR, Johnson AT, Lubin JH, Hein DW, Dagnall CL, Colt JS, Kida M, Jones MA, Schned AR, Cherala SS, Chanock SJ, Cantor KP, Silverman DT, Rothman N (2010) *GSTM1* null and *NAT2* slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and *NAT2* meta-analysis. *Carcinogenesis*, 32: 182–189.
- Murakami Y (2009) Advances in genome analysis of solid tumors. *Nippon Rinsho* 67(6): 1115-9.
- Nishiyama M and Eguchi H (2008) Pharmacokinetics and pharmacogenomics in gastric cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 402-407.
- Neel JV (1973) “Private” genetic variants and the frequency of mutations among South American Indians. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3311-3315.
- Oh JH (2010) Study on association between an H-RAS gene polymorphism and gastric cancer development. *Korean J. Gastroenterol* 56(2):78-82.
- Ochs-balcom HM, Wiesner G, Elston RC (2007) A meta-analysis of the association of N-acetyltransferase 2 gene (*NAT2*) variants with breast cancer. *American Journal of Epidemiology*, 166: 246- 254.
- Parkin DM (2011) Cancers attributable to dietary factors in the UK in 2010. *IV Salt. British Journal of Cancer* 105, S31 – S33.
- Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, Oliveira LF, Henderson BL, Castro AP, Maia MH, Barbosa FB, Santos SE, Guerreiro JF, Sena L, Santos EJ (2011) Systemic lupus erythematosus: association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical

- manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus* 20(3): 265-73.
- Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL (2011) BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer .In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-1998.
- Ponder BAJ (1990) Inherited predisposition to cancer. *TIG* 6: 213-218.
- Possuelo LG, Castelan JA, De Brito TC (2008) Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Pharmacogenetics* 64: 673-681.
- Pritchard JK, Rosenberg NA (1999) Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet.* 65: 220-228.
- Reich DE and Goldstein DB (2001) Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. *Genet Epidemiol* 20: 4-16.
- Resende ALS, Matos IE, Koifman S (2006) Dieta e câncer gástrico: aspectos históricos associados ao padrão de consumo alimentar no estado do Pará. *Rev Nutr.* 19 (4):511-519.
- Resza E, Wasowicz W, Gromadzinska J (2006) Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *British Journal of Nutrition* 96: 609-619.
- Risch N, Burchard E, Ziv E, Tang H (2002) Categorization of humans in biomedical research: genes, race, and disease. *Genome Biol* 3: 1-12.
- Romieu I (2011) Diet and breast cancer. *Salud Publica Mex* 53:430-439.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW (2002) Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381-2385.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Roy P, Majumder M, Roy B (2008) Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics*, 9: 311-321.
- Rozen S and Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
- Scartozzi M, Bittoni A, Pistelli M, Galizia E, Berardi R, Giampieri R, Faloppi L, Cascinu S (2009) Toward molecularly selected chemotherapy for advanced gastric cancer: State of the art and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews* 35: 451-462.
- Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES (2008) Worldwide distribution of *NAT2* diversity: Implications for *NAT2* evolutionary history. *BMC Genet* 9: 21.
- Sabbagh A, Darlu P, Crouau-Roy B, Poloni ES (2011) Arylamine N-Acetyltransferase 2 (*NAT2*) Genetic Diversity and Traditional Subsistence: A Worldwide Population Survey. *PLoS ONE*, 6.
- Salzano FM, Bortolini MC (2002) The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University press, Cambridge, UK.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2ª edição. Cold Spring Harbor, New York, 1626 pp.
- Sandy J, Holton S, Fullam E (2005) Binding of the Anti-tubercular Drug Isoniazid to the Arylamine N-Acetyltransferase Protein from *Mycobacterium smegmatis*.

- Protein Science 14: 775-782.
- Sangrajang S, Sato Y, Sakamoto H, Ohnami S, Khuhaprema T, Yoshida T (2010) Genetic polymorphisms in folate and alcohol metabolism and breast cancer risk: a case-control study in Thai women. *Breast Cancer Res Treat* 123:885–893.
- Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-santos AKC et al. (2009) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 insertion-deletion ancestry informative markers panel. *Human mutation*, 31: 184-190.
- Santos NPC, Jacques SMC, Santos AKCR, Santos, SEB, Silva CA, Vallinoto ACR, Fernandes DCRO, Carvalho DC, HUTZ MH (2013) N-acetyl transferase 2 and cytochrome P4502E1 genes and isoniazid-induced hepatotoxicity in Brazilian patients. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 17(4): 499-504.
- Schneider BP, Shen F, Miller KD (2012) Pharmacogenetic biomarkers for the prediction of response to antiangiogenic treatment. *Lancet Oncol* 13(10).
- Schriner MD, Smith MW, Jin L, Marcini A, Akey JM, Deka R, Ferrell RE (1997) Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* 60: 957-964.
- Shaaf HS, Parkin DP, Seifart, HI (2005) Isoniazid Pharmacokinetics in Children Treated for Respiratory Tuberculosis. *Arch. Dis. Child*, 90: 614-618.
- Shakya R, Rao BS, Shrestha B (2005) Management of antitubercular drugs-induced Hepatotoxicity and Therapy Reintroduction Strategy in a TB Clinic of Nepal. *Kathmandu University Medical Journal* 3: 45-49.
- Sidle A, Palaty C, Dirks P, Wiggan O, Kiess M, Gill RM, Wong AK, Hamel PA (1996) Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31(3):237-71.
- Sillanpaa P, Hirvonen A, Kataja V, Eskelinen M, Kosma V, Uusitupa M, Vainio H, Mitrunen K (2005) NAT2 slow acetylator genotype as an important modifier of breast cancer risk. *Int. J. Cancer* 114: 579–584.
- Silva TCR, Leal MF, Calcagno DQ, Souza CRT, Khayat AS, Santos NPC, Montenegro RC, Rabenhorst SHB, Nascimento MQ, Assumpção PP, Smith MAC, Burbano RR (2012) hTERT, MYC and TP53 deregulation in gastric preneoplastic lesions. *BMC Gastroenterology*, 12:85.
- Skorodumova LO, Muriaev AA, Volodina EV, Ivanov Slu, Gnuchev NV, Georgiev GP, Larin SS (2012) Molecular risk markers for malignant transformation of oral mucosal leukoplakia. *Vopr Onkol* 58(3):327-32.
- Snustad DP and Simmons MJ (2010) *Fundamentos de GENÉTICA*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4ª edição, pp 903.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978–989.
- Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen AO *et al.* (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460(7256): 744–747.
- Suarez-Kurtz G (2007) Synopsis and perspectives. In *Pharmacogenomics in Admixed Populations*. Landes Biosciences. Austin, USA.
- Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DRT, Costa DC, Furlani NG, Zuccherato LW, Machado M, Reid ME, Zalis MG, Rossit AR, Santos SEB, Machado RL, Lustigman S (2011) Population Genetics of GYPB and Association Study between GYPB*S/s Polymorphism and Susceptibility to *P. falciparum* Infection in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE* 6.

- Teixeira RLF, Miranda AB, Pacheco AG Lopes MQ, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, Melo HM, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, et al. (2007) Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutation Research* 62: 31-30.
- Teixeira RL, Silva FP Jr, Silveira AR, Cabello PH, Mendonça-Lima L, Rabahi MF, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, de Miranda AB and Santos AR (2010) Sequence analysis of *NAT2* gene in Brazilians: identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. *Mutat Res* 683: 43-49.
- Thumar J, Giesen E, Kluger HM (2012) Drug targets and predictive biomarkers in the management of metastatic melanoma. *Pharmgenomics Pers Med* 5:139-48.
- Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD (2000) Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 9:1381-1385.
- Ulrich CM, Robien K, McLeod HL (2003) Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. *Nature Reviews Cancer* 3.
- Upton AM, Mushtaq A, Victor TC, Sampson SL, Sandy J, Smith D-M, Van Helden PV and Sim E (2001) Arylamine N-Acetyltransferase of *Mycobacterium tuberculosis* is a Polymorphic Enzyme and a Site of Isoniazid Metabolism. *Molecular Microbiology* 42: 309-317.
- Vogelstein B and Kinzler KW (2004) Cancer genes and pathways they control. *Nature Medicine* 10:789-799.
- Walraven JM, Zang Y, Trent JO (2008) Structure/Function Evaluations of Single Nucleotide Polymorphisms in Human N-Acetyltransferase 2. *Curr. Drug. Metab* 9: 471-486.
- Wang S, Tian Y, Wu D, Zhu H, Luo D, Gong W, Zhou Y, Zhou J, Zhang Z (2012) Genetic variation of *CTNNB1* gene is associated with susceptibility and prognosis of gastric cancer in a Chinese population. *Mutagenesis* 27(6):623-30.
- World health organization- WHO (2009) World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Weber BL and Nathanson KL (2000) Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *European Journal of Cancer*, 36: 1193-1199.
- Weinberg RA (2008) *A biologia do Câncer*. Artmed Editora, Porto Alegre, pp 864.
- Willard SS and Koochekpour S (2012) Regulators of gene expression as biomarkers for prostate cancer. *Am J Cancer Res* 2(6):620-57.
- Windmill KF, Gardigk A, Hall PM (2000) Localization of N-acetyltransferases *NAT1* e *NAT2* in Human tissues. *Toxicology. Sciences* 54: 19-29.
- Wong MW, Nordfors C, Mossman D, Pecenpetelovska G, Avery-Kiejda KA, Talseth-Palmer B, Bowden NA, Scott RJ (2011) *BRIP1*, *PALB2*, and *RAD51C* mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 127:853–859.
- Yin Y and Shen WH (2008) *PTEN*: a new guardian of the genome. *Oncogene* 27, 5443–5453.
- Yuzhalin AE and Kutikhin AG (2012) Integrative systems of genomic risk markers for cancer and other diseases: future of predictive medicine. *Cancer Manag Res* 4:131-5.
- Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW (2007) Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis* 8: 1665–1671.

- Zhang YW, Eom S, Kim Y, Song Y, Yun H, Park J, Youn S, Kim BS, Kim H, Hein DW (2009) Effects of Dietary Factors and the *NAT2* Acetylator Status on Gastric Cancer in Koreans. *Int J Cancer* 125: 139–145.
- Zhang J, Qiu L, Wang Z, Wang J, He S, Hu X (2010) *NAT2* polymorphisms combining with smoking associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 123: 877–883.
- Zhong X, Hui C, Xiao-Ling W, Yan L, Na L (2010) *NAT2* polymorphism and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. *Arch Med Res* 41(4):275-80.
- Ziv E and EG Burcharel (2003) Human population structure and genetic association studies. *Pharmacogenomics* 4: 431-441.

REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

- American society of clinical oncology- ASCO (2012) All about cancer. Genetics. Disponível em: <http://www.cancer.net/all-about-cancer/genetics>
- American cancer society– ACS (2013) Learn about câncer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/index>
- Genetics Home Reference (2013a) Genes: ERBB2. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERBB2>
- Genetics Home Reference (2013b) Genes: TP53. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>
- Genetics Home Reference (2013c) Genes: BRCA1. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1>
- Genetics Home Reference (2013d) Genes: APC. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APC>
- Genetics Home Reference (2013e) Genes: PTEN. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN>
- Genetics Home Reference (2013f) Genes: RB1. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RB1>
- Globocan (2008) Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008. International Agency for research of cancer. World Health organization. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>
- Instituto Nacional do Câncer-INCA (2012) Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
- National cancer institute-NCI (2012) Cancer topics. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics>
- Programa Struture software v 2.2. Disponível em: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>
- Human *NAT2* alleles. Consenso de denominação dos haplótipos do gene *NAT2*. Disponível em: <http://louisville.edu/medschool/pharmacology/consensus->

[human-arylamine-n-acetyltransferase-gene-nomenclature/nat_pdf_files/Human NAT2 alleles.pdf](#)

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

1. Termo de aprovação do Comitê de ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto-HUJBB.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COORDENADORIA DE ATIVIDADES ACADÊMICAS
DIVISÃO DE PESQUISA E EXTENSÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 14.05.2004, o projeto de pesquisa intitulado "*Genética do Câncer Gástrico*", desenvolvido por Marília de Arruda Cardoso Smith, Rommel Burbano, Silvia Regina Caminada de Toledo, Maisa Yoshimoto, Eleonidas Moura de Lima, Cacilda Casartelli e André Salim Khayat, sob a Orientação do Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção, obtendo **APROVAÇÃO** para desenvolvê-lo nesta instituição.

Belém, 14 de maio de 2004


DR. EDUARDO LEITÃO MAIA

CRM 1997

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa/ HUJBB

2. Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°043 /2008-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** C-MYC COMO PREDITOR DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM CÂNCER MAMÁRIO.
3. **Pesquisador Responsável:** Cyntia Mara Brito Lins Pereira.
4. **Instituição / Unidade:** ICB/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 10/09/2008.
6. **Data do Parecer:** 28/10/2008.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 19 de dezembro de 2008.


Prof. Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.