

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES
***NAT2*, *XRCC1* E *hOGG1* COM O RISCO E A PROGRESSÃO DO**
CARCINOMA DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES

CINTIA RODRIGUES MARQUES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2012

CINTIA RODIGUES MARQUES

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES
NAT2, *XRCC1* E *hOGG1* COM O RISCO E A PROGRESSÃO DO
CARCINOMA DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da
Universidade Estadual de Santa Cruz para obtenção do
título de Mestre.

Área de Concentração: Genética e Biologia
Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2012

CINTIA RODIGUES MARQUES

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES
NAT2, *XRCC1* E *hOGG1* COM O RISCO E A PROGRESSÃO DO
CARCINOMA DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da
Universidade Estadual de Santa Cruz para obtenção do
título de Mestre.

Área de Concentração: Genética e Biologia
Molecular

APROVADA: 24 DE ABRIL DE 2012

Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
UFPE

Marcílio Delan Baliza Fernandes
UFRB

Prof. Dr. Jerônimo Pereira França
UESC

Fabício Rios Santos
UESC (Orientador)

DEDICATÓRIA

A todos sem os quais este trabalho não seria possível...
...em especial ao meu companheiro Thiago.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, mesmo quando não me dava conta de Sua presença; por me conceder as oportunidades, me instruindo e me guiando pelos caminhos corretos.

Aos meus familiares pelo apoio concedido ao longo dessa jornada. Em especial àqueles que sempre acreditaram em mim e nas minhas conquistas.

À Universidade Estadual de Santa Cruz que me acolheu desde a graduação e fará eternamente parte de minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de desenvolver este trabalho e me aperfeiçoar academicamente.

Ao meu orientador, Dr. Fabrício Rios Santos, pelas instruções e acima de tudo pela confiança em mim depositada.

A minha co-orientadora, Sandra Mara Bispo Sousa pelo tempo e contribuição neste trabalho, e também por sua imensa simpatia.

À Profa. Carla Cristina Romano pelo apoio desde os tempos de graduação e por ser um exemplo de pessoa e profissional. Admiro muito!

Ao Dr. Marcílio Ferreira Marques Filho, pela co-orientação, pelos esclarecimentos e ajuda fundamentais para a execução desse trabalho.

À Dr. Liane Rossi, pela ajuda dada no recrutamento dos pacientes e pela forma solícita e cordial com que sempre se pôs à disposição para contribuir com o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Dr. Ari Paranhos, por se colocar à inteira disposição para ajudar no recrutamento dos pacientes do grupo controle.

À Dulcineia Martins de Albuquerque, ou simplesmente Du, por me receber em seu laboratório e me proporcionar a mais bela das artes, o conhecimento. Pela simpatia, simplicidade e pelo apoio e credibilidade em nosso trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UESC que contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional ao longo desse período, em especial ao Prof. Leandro Lopes.

À Fabrícia Silva que sempre tornou nossos dias na pós-graduação mais fáceis, por sua simpatia, generosidade e competência.

Aos colegas de laboratório Mille Oliver, Rao, Ronaldinho, Jairo, Elias e Meiry, por proporcionarem um ambiente descontraído e agradável.

Às grandes amigas fruto desta etapa da minha vida: Mille, Bruna, Fernanda. As quais dividiram o tempo e inúmeros momentos inesquecíveis.

À Drika, amiga pela qual tenho grande admiração, por sua inteligência, determinação e simpatia. Desejo sempre coisas boas.

Ao querido colega e amigo Guga que sempre me ensinou e continua me ensinando muito. Por sua simpatia, carisma e hospitalidade.

Ao meu querido companheiro Thiago, por me ensinar academicamente e cientificamente quase tudo que não consegui aprender nos livros e na sala de aula. Pelas correções, sugestões e orientações neste trabalho. Por sua simplicidade, paciência, simpatia e inteligência. Agradeço por estar presente todos esses anos, tornando os meus dias muito especiais.

A todos os pacientes, um a um, sem os quais este trabalho não seria possível. Desejo que seus sofrimentos sejam amenizados e que tenham a cura. E que nosso trabalho possa contribuir de alguma forma para isso.

À FAPESB e CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado no primeiro e segundo ano respectivamente.

Muito Obrigada!

*Às grandes vitórias, os
grandes vencedores.*

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Resumo | xi |
| Abstract | xii |
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | |
| 2.1. Carcinoma das Vias Aerodigestivas Superiores..... | 17 |
| 2.2. Epidemiologia..... | 17 |
| 2.3. Fatores de Risco..... | 18 |
| 2.4. Fatores Genéticos..... | 19 |
| 2.5. N-acetiltransferase 2..... | 19 |
| 2.5.1. Fenótipos do <i>NAT2</i> | 21 |
| 2.5.2. Genótipos do <i>NAT2</i> | 21 |
| 2.6. <i>X-Ray Repair Cross Complementary 1</i> | 22 |
| 2.7. <i>Oxoguanine Glycosylase 1</i> | 23 |
| 3. OBJETIVOS | 25 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | |
| 4.1 Sujeitos da Pesquisa..... | 26 |
| 4.1.1 Casos..... | 26 |
| 4.1.2 Controles..... | 27 |
| 4.2 Material biológico..... | 27 |
| 4.3 Genotipagem do gene <i>NAT2</i> | |
| 4.3.1 PCR para o gene <i>NAT2</i> | 27 |
| 4.3.2 Sequenciamento do gene <i>NAT2</i> | 28 |
| 4.4. Genotipagem do polimorfismo Arg399Gln no XRCC1 | |
| 4.4.1 PCR para o gene XRCC1..... | 29 |
| 4.4.2 RFLP para o gene XRCC1..... | 30 |
| 4.5. Genotipagem do polimorfismo Ser326Cys no gene hOGG1 | |
| 4.5.1 PCR para o gene hOGG1..... | 30 |
| 4.5.2 RFLP para o gene hOGG1..... | 31 |
| 4.4 Análises Estatísticas..... | 31 |
| 5. RESULTADOS | 33 |
| 6. DISCUSSÃO | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 7. CONCLUSÕES..... | 55 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |
| ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | |
| ANEXO 2. QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO | |

MARQUES, Cintia Rodrigues, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro 2012. **Estudo da associação de polimorfismos nos genes *NAT2*, *XRCC1* e *hOGG1* com o risco e a progressão do carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores.** Orientador: Fabrício Rios Santos. Co-orientador: Sandra Mara Bispo Sousa.

RESUMO

Polimorfismos que afetam a função de genes envolvidos na detoxificação de compostos carcinogênicos e reparo de danos ao DNA podem influenciar o risco individual de desenvolvimento de câncer. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar associações dos padrões alélicos do gene que codifica para a enzima N-acetiltransferase 2 (*NAT2*) e seus respectivos perfis de acetilação (rápido, intermediário e lento), bem como de polimorfismos dos genes de reparo de DNA *XRCC1* e *hOGG1* com o risco e características clínicas (estadio clínico, grau histológico, tamanho do tumor, e metástases para linfonodos regionais) do carcinoma de vias aerodigestivas superiores (CVAS). Para isso, foi avaliado um grupo composto por 298 indivíduos (116 casos e 182 controles), do qual foi coletada uma amostra de sangue para extração de DNA e posterior genotipagem pelos métodos de sequenciamento automático, para o gene *NAT2*, e PCR-RFLP, para os polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *hOGG1* Ser326Cys. Na análise geral não foram observadas associações significantes entre os perfis de acetilação de *NAT2* e o risco de CVAS. O haplótipo *NAT2**C, contudo, foi significativamente associado como um fator de proteção para o desenvolvimento de CVAS (OR: 4,31; IC 95%: 1,13 – 16,48; p = 0,023). Os polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *hOGG1* Ser326Cys também não foram associados ao risco de CVAS em nenhum dos modelos genéticos de doença considerados. Nas análises de interação gene-ambiente verificou-se que o polimorfismo *hOGG1* Ser326Cys foi associado como um fator de proteção para o CVAS entre fumantes moderados (OR: 0,35; IC 95% 0,12 - 0,99; p = 0,044). O polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln, por sua vez, foi significativamente associado como um fator de proteção para o CVAS apenas entre os nunca-etilistas (OR: 0,37; IC 95% 0,14 - 0,96; p = 0,037). Interações gene-gene significantes foram observadas entre os polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *hOGG1* Ser326Cys, com os indivíduos que portaram ao menos uma cópia do alelo mutante desses genes apresentando um risco menor de desenvolvimento de CVAS comparativamente aos duplo-selvagens (OR ajustada: 0,41; IC 95%: 0,18 - 0,93; p = 0,033). Nenhuma associação significativa foi observada entre os perfis de acetilação de *NAT2* ou os polimorfismos de *XRCC1* e *hOGG1* e os parâmetros clinicopatológicos do CVAS. Em conclusão, o presente estudo sugere que interações gene-gene e gene-ambiente significantes entre os polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *hOGG1* Ser326Cys podem modular o risco de desenvolvimento de CVAS na população avaliada.

Palavras-chave: metabolização de carcinógenos, polimorfismos, reparo de DNA, carcinoma de vias areodigestivas superiores

MARQUES, Cintia Rodrigues, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro 2012. **Study of association of polymorphisms in *NAT2*, *XRCC1* and *hOGG1* with risk and progression of squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract.** Advisor: Fabrício Rios Santos. Co-advisor: Sandra Mara Bispo Sousa.

ABSTRACT

Polymorphisms affecting the function of genes involved in detoxification of carcinogenic compounds and DNA repair can influence the risk of cancer. The present study aimed to evaluate associations between polymorphisms and acetylation profiles of the gene encoding the enzyme N-cetyltransferase 2 (*NAT2*), as well polymorphisms of *hOGG1* and *XRCC1* DNA repair genes, and risk of the upper aerodigestive tract (UADT) cancers. Associations between clinical characteristics (clinical stage, histological grade, tumor size and metastases to regional lymph nodes) and these polymorphisms were evaluated as well. We carried out a case-control study including 116 cases and 182 controls, which was collected a blood sample for DNA extraction. The *NAT2* gene and *XRCC1* Arg399Gln and *hOGG1* Ser326Cys polymorphisms were genotyping by automated sequencing and PCR-RFLP methods, respectively. In the overall analysis there were no significant associations between *NAT2* acetylation profiles and the risk of UADT cancer. However, the *NAT2**C haplotype was significantly associated as a risk factor for the development of UADT cancers (OR). The polymorphisms *XRCC1* Arg399Gln and *hOGG1* Ser326Cys were not associated with risk of UADT cancers in any of the genetic models considered. The *hOGG1* Ser326Cys polymorphism was associated as a protective factor for the UADT cancers between moderate smokers (OR). The *XRCC1* Arg399Gln polymorphism, in turn, was significantly associated as a protective factor for the UADT cancers only among never-drinkers (OR). Significant gene-gene interactions were observed between *XRCC1* Arg399Gln and *hOGG1* Ser326Cys polymorphisms, with individuals that carried at least one copy of the mutant allele of these genes presenting a lower risk of UADT cancer compared to double wild-type (OR). Neither *NAT2* acetylation profiles nor *hOGG1* and *XRCC1* polymorphisms were associated with clinicopathological parameters of UADT cancers. In conclusion, this study suggests that significant gene-gene and gene-environment interactions among *XRCC1* Arg399Gln and *hOGG1* Ser326Cys polymorphisms may modulate the risk of UADT cancers in this population.

Key-words: carcinogens metabolism, polymorphisms, DNA repair, upper aerodigestive tract cancers

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Anatomia das vias aerodigestivas superiores..... | 17 |
| Figura 2 - Estimativa de câncer para 2010..... | 18 |
| Figura 3 - Estrutura bioquímica da NAT2 humana..... | 20 |
| Figura 4 - Metabolismo de arilaminas catalisado pela NAT2..... | 20 |
| Figura 5 - Esquema de reparo por excisão..... | 24 |
| Figura 6 - Resultado do alinhamento das sequências para <i>NAT2</i> | 29 |
| Figura 7 - Gel de eletroforese para PCR-RFLP do gene <i>XRCC1</i> | 30 |
| Figura 8 - Gel de eletroforese para PCR-RFLP do gene <i>hOGG1</i> | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Sumário dos efeitos dos SNPs..... | 22 |
| Tabela 2 – Oligonucleotídeos sintéticos para o gene NAT2..... | 28 |
| Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação de sequenciamento..... | 28 |
| Tabela 4 - Condições da reação de sequenciamento..... | 28 |
| Tabela 5 - Características demográficas e hábitos de vida entre casos e controles..... | 34 |
| Tabela 6 - Distribuição de frequências genotípicas e alélicas NAT2..... | 35 |
| Tabela 7 - Distribuição de frequências genotípicas e alélicas para o NAT2..... | 36 |
| Tabela 8 - Distribuição dos diferentes haplótipos para NAT2..... | 37 |
| Tabela 9 - Associação entre os fenótipos N-acetiladores de XRCC1, hOGG1 e os fenótipos acetiladores do NAT2 com o risco de CVAS..... | 38 |
| Tabela 10 - Modelo de regressão logística multivariada dos fatores de risco para o CVAS... | 39 |
| Tabela 11 - Associações estratificadas por categorias de fumantes entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln, hOGG1Ser326Cys e os fenótipos acetiladores de NAT2 com o risco de CVA..... | 40 |
| Tabela 12 - Associações entre os fenótipos acetiladores de NAT2 e o risco de CVAS estratificadas por categorias de etilistas..... | 43 |
| Tabela 13 - Distribuição dos polimorfismos de XRCC1 e hOGG1 e fenótipos N-acetiladores entre os casos de CVAS de acordo com diferentes parâmetros clinicopatológicos..... | 45 |
| Tabela 14 – Interação entre XRCC1, hOGG1 e perfil de acetilação para NAT2 e o risco de CVAS..... | 46 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| 8-OHdG | 7,8-Dihydro-8-oxoguanine |
| CLIONI | Clínica Oncológica de Ilhéus |
| CVAS | Carcinoma das Vias Aerodigestivas Superiores |
| EHW | Equilíbrio de Hardy-Weinberg |
| G1 | (Grau 1) Carcinoma Espinocelular Bem Diferenciado |
| G2 | (Grau 2) Carcinoma Espinocelular Moderadamente Diferenciado |
| G3 | (Grau 3) Carcinoma Espinocelular Pouco Diferenciado |
| hOGG1 | 8-Oxiguanina DNA Glicosilase humana |
| IC | Intervalo de Confiança |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| LIG3 | Ligase 3 |
| M | Metástases a distância |
| N | Acometimento de nódulos cervicais |
| NAT2 | N-acetiltransferase 2 |
| OR | Odds ratio (Razão de chances) |
| p | Probabilidade |
| pb | Pares de Bases |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| Pol β | Polimerase β |
| RFLP | Polimorfismo de comprimento longo de restrição |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo simples) |
| T | (T1, T2, T3 e T4) Tamanho do tumor |
| UNACON | Unidade de Alta Complexidade em Oncologia |
| XRCC1 | Enzima de Reparo de Raios-X por Complementação Cruzada |
| χ^2 | Teste exato de qui-quadrado |

1. INTRODUÇÃO

O Carcinoma das vias aerodigestivas superiores (CVAS) é responsável por cerca de 5% de todos os novos cânceres diagnosticados, sendo a oitava causa mundial de morte por câncer (Choong e Vokes, 2008). Sua incidência varia significativamente entre diferentes regiões geográficas do mundo (Shibuya *et al.*, 2002; Kamangar *et al.*, 2006). Os principais fatores etiológicos fortemente associados com o carcinoma das vias aerodigestivas superiores são o tabagismo e o etilismo (Kato *et al.*, 1992; Kato e Nomura, 1994). O cigarro é um complexo de misturas de mais de 5.300 substâncias químicas já identificadas, sendo muitas dessas, capazes de induzir câncer (Rodgman *et al.*, 2000). Além dos carcinógenos, a bioativação enzimática de pró-carcinógenos presentes no cigarro e álcool contribue para danos no DNA e genotoxicidade (Hecht, 2003).

Polimorfismos que afetam a função de genes envolvidos na ativação e detoxificação de compostos carcinogênicos, bioativação de pró-carcinógenos e reparo a danos no DNA podem influenciar o risco individual de desenvolvimento de câncer (Demokan *et al.*, 2010). Estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado uma relação entre os polimorfismos presentes no gene N-acetiltransferase 2 (*NAT2*), enzima de Reparo de Raios-X por Complementação Cruzada (*XRCC1*) e 8-Oxiguanina DNA Glicosilase humana (*hOGG1*) e o risco individual para diversos cânceres como o de bexiga, colorretal, mama, próstata, pâncreas, pulmão (Badawi *et al.*, 1995; Brockton *et al.*, 2000; Hung *et al.*, 2005).

A *NAT2* é uma enzima de fase II capaz de realizar N-acetilação, O-acetilação e N,O-acetilação, além de metabolizar algumas aminas aromáticas e drogas hidrazinas (Weber e Hein, 1985). A *NAT2* modifica a predisposição a cânceres com o papel na bioativação e detoxificação de carcinógenos aromáticos e aminas heterocíclicas (Hein *et al.*, 2000). Esta influência no desenvolvimento a câncer pode estar relacionada a diferenças na atividade catalítica da enzima. Este evento pode ser atribuído aos polimorfismos de nucleotídeo único presentes na região codificadora do gene *NAT2*. Esses polimorfismos estão associados à alteração na atividade catalítica da enzima, que pode exibir um fenótipo lento ou rápido. A capacidade diferenciada de metabolização interindividual é explicada pela variabilidade genética deste gene na espécie humana.

Os compostos presentes na fumaça do cigarro também estão associados com o aumento da formação de lesões no DNA, incluindo as induzidas pelo estresse oxidativo, as quais podem ser reparadas por distintos mecanismos celulares de correção de danos ao DNA.

Estes danos são reparados por enzimas de reparo do DNA como exemplo as enzimas XRCC1 e hOGG1 (Paz-Elizur *et al.*, 2008).

A hOGG1 participa de uma curta via de reparo por excisão de base juntamente com algumas outras enzimas, dentre elas a XRCC1. A hOGG1 remove as bases danificadas (8-OHdG), posteriormente uma endonuclease I (APE1/HAP1) reconhece e cliva o sítio com a base faltante, introduzindo uma quebra na fita de DNA; por fim, a proteína XRCC1 forma um ancoramento para polimerase β Pol β e ligase III (LIG3) no sítio a ser reparado (Weiss *et al.*, 2005).

Alguns polimorfismos já foram descritos tanto para o gene *hOGG1* como para XRCC1 e podem estar associados a alterações na atividade catalítica da enzima. Variações polimórficas nesses genes envolvidos com o reparo a danos no DNA com impacto na função proteica podem ter consequências na capacidade de reparo e isso pode levar ao aumento no risco de carcinogênese.

A caracterização de mutações e polimorfismos genéticos permite a identificação da suscetibilidade individual e/ou populacional ao câncer, conduzindo a novas perspectivas para a prevenção, diagnóstico precoce e aconselhamento genético. Além disso, fornece informações sobre a avaliação do risco adicional associado à exposição, os fatores genéticos do indivíduo e os meios de proteger a população de tais perigos.

Nesse contexto, é hipotetizado que polimorfismos nos genes *NAT2*, *XRCC1* e *hOGG1* podem influenciar no risco de desenvolvimento do carcinoma das vias aerodigestivas superiores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma das Vias Aerodigestivas Superiores

O termo câncer de cabeça e pescoço engloba uma variedade de neoplasias malignas cuja origem é a mucosa do segmento aerodigestivo superior. O Carcinoma das vias aerodigestivas superiores (CVAS) consiste em uma dessas variedades de doenças que acomete regiões anatomicamente distintas denominadas de cavidade oral, laringe, orofaringe, nasofaringe e hipofaringe como observado na Figura 1 (Choong e Vokes, 2008).

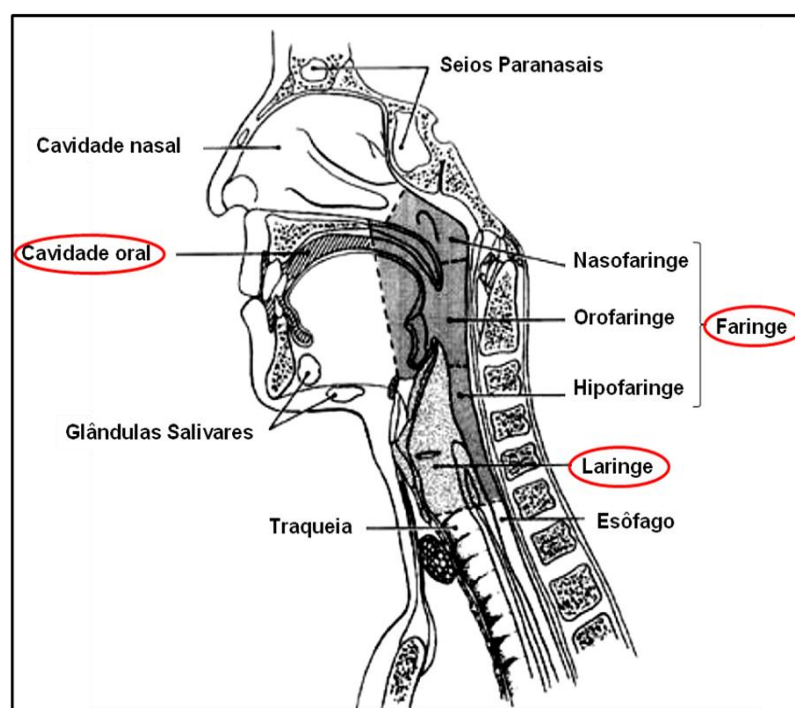


Figura 1 - Anatomia das vias aerodigestivas superiores. Modificado de Choong *et al.*, 2007.

2.2 Epidemiologia

Os carcinomas das vias aerodigestivas superiores ou de cabeça e pescoço são responsáveis por cerca de 5% de todos os novos cânceres diagnosticados, sendo a oitava causa de morte por câncer no mundo (Choong e Vokes, 2008). A mortalidade é de aproximadamente 50% em ambos os sexos para os países em desenvolvimento (Parkin *et al.*, 2005). Sua incidência varia significativamente entre diferentes regiões geográficas do mundo (Shibuya *et al.*, 2002; Kamangar *et al.*, 2006). Na América do Norte e União Européia, esses tumores representam 3% a 4% de todos os casos de câncer diagnosticados. No Sudeste

Asiático e África, por sua vez, essas neoplasias respondem por 8% a 10% de todos os casos de câncer diagnosticados anualmente (Kamangar *et al.*, 2006). E no Brasil, corresponde a 3% de todos os novos casos.

No Brasil, considerando todos os casos novos de câncer, com exceção de pele não melanoma, a cavidade oral ocupa a 7ª posição (Figura 2). Quando analisado os tipos de cânceres que atingem ambos os sexos ele passa para 4º lugar (INCA, 2010). Para o estado da Bahia, estima-se para 2011, o surgimento de 790 novos casos com o sítio primário de cavidade oral e para a capital, Salvador é estimado 250 novos casos. (INCA, 2010).

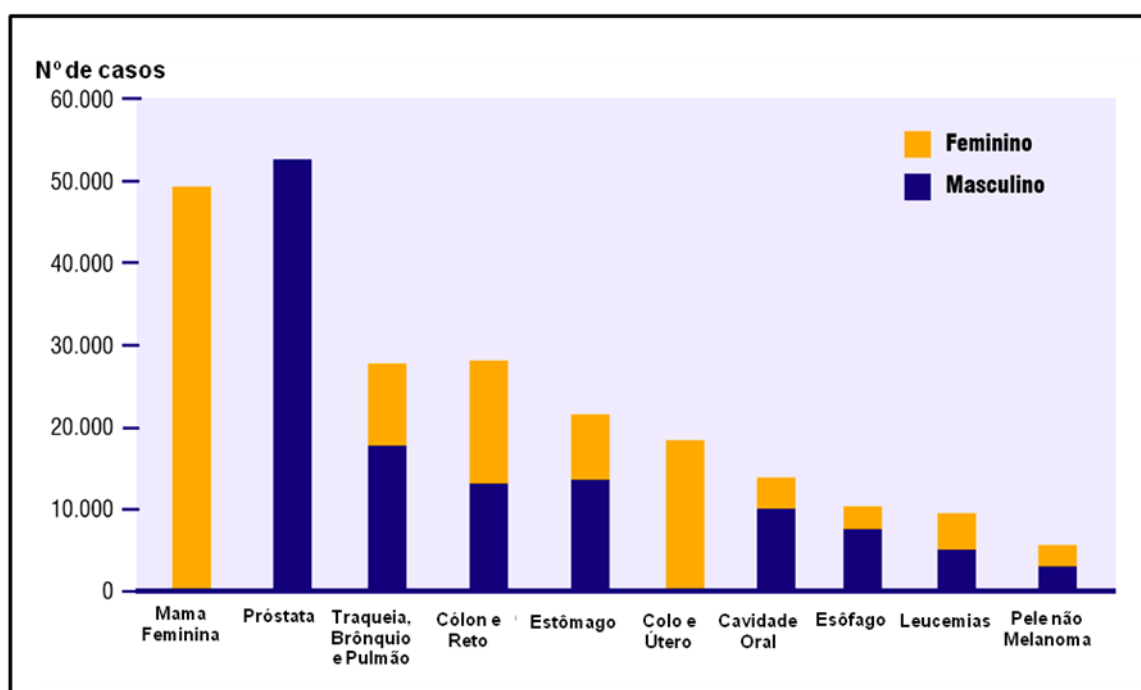


Figura 2. Estimativa de câncer para 2010. Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira (INCA, 2010)

2.3 Fatores de risco

Os principais fatores etiológicos fortemente associados com o carcinoma das vias aerodigestivas superiores são o tabagismo e o etilismo (Kato *et al.*, 1992; Kato e Nomura, 1994). O risco de desenvolvimento dessa neoplasia é proporcional ao número de cigarros, tempo de fumo e interação com o álcool (Franceschi *et al.*, 1990; Talamini *et al.*, 1990). O cigarro é um complexo de misturas de mais de 5.300 substâncias químicas já identificadas e pelo menos 150 são conhecidas pelas propriedades específicas toxicológicas (Rodgman *et al.*, 2000). Muitas dessas substâncias são capazes de induzir câncer, e um exemplo é o

benzoapireno (Cunningham *et al.*). Além dos carcinógenos, a bioativação enzimática de pró-carcinógenos presentes no cigarro e álcool contribue para danos no DNA e genotoxicidade (Hecht, 2003). Além disso, o álcool e o tabaco exibem um efeito sinérgico na elevação do risco, dado que os indivíduos expostos simultaneamente a esses dois fatores apresentam uma chance 10 a 15 vezes maior de desenvolvimento desses tipos cânceres (Pollock, 2006). Outros fatores ambientais têm sido associados ao risco de CVAS. Ocupações como a carpintaria, fabricação de móveis e o refino de níquel são associadas a um maior risco. A exposição ao asbesto, a fibras têxteis ou ao acabamento de couro parece elevar o risco, como também a exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ou substâncias químicas radioativas (Boyer, 2000).

2.4 Fatores Genéticos associados ao CVAS

Os agentes capazes de induzir os eventos de transformação celular em câncer, denominados carcinógenos, podem ser de natureza química, física ou biológica (Boyer, 2000). Assim, é possível inferir que parte do risco de desenvolvimento de câncer depende dos carcinógenos presentes no ambiente. No entanto, a capacidade de metabolização destes compostos pode variar de um indivíduo para outro. A base bioquímica para essa variação consiste nos polimorfismos genéticos presentes naturalmente nas populações. Polimorfismos que afetam a função de genes envolvidos na ativação e detoxificação de compostos carcinogênicos, bioativação de pró-carcinógenos e reparo a danos no DNA podem influenciar o risco individual de desenvolvimento de câncer (Demokan *et al.*, 2010).

2.5 N-acetyltransferase 2

A N-acetyltransferase 2 ou arilamina N-acetyltransferase, símbolo oficial NAT2, é uma enzima citosólica de aproximadamente 30kDa, 290 aminoácidos dispostos em 3 domínios (Figura 3). Está presente em muitas espécies desde Micobactéria ao homem.

A enzima NAT2 é uma enzima de fase II capaz de realizar N-acetilação, O-acetilação e N,O-acetilação como observado na Figura 4, sendo que a N-acetilação é a via de detoxificação; a O-acetilação e N,O-acetilação ocorre em vias de metabolização alternativas (Vatsis *et al.*, 1995).

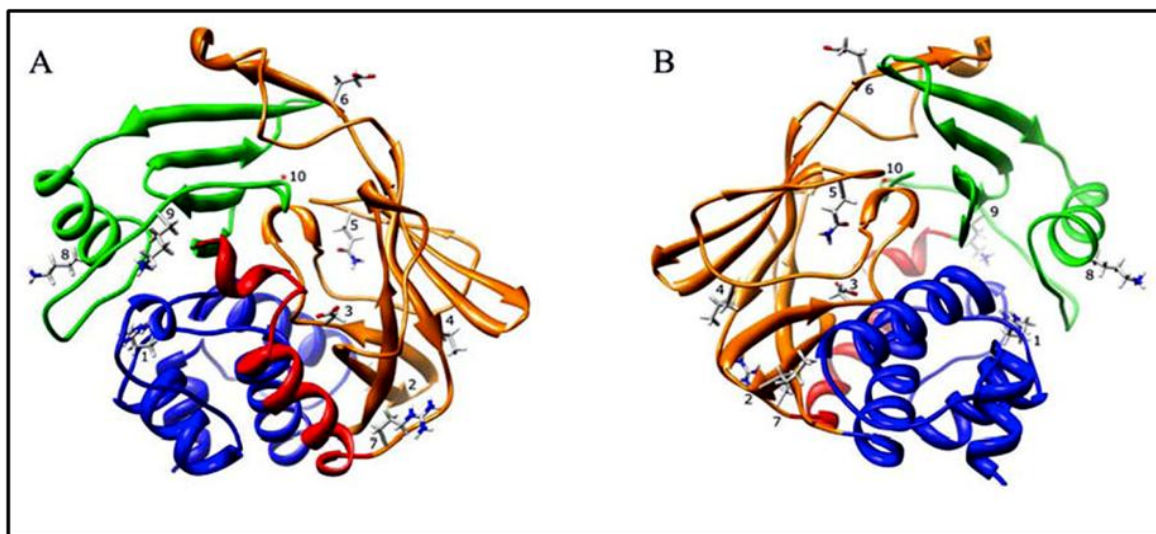


Figura 3 – Estrutura bioquímica da NAT2 humana.

As diferentes cores indicam os domínios I (azul), II (laranja) e III (verde). As numerações indicam a posição dos resíduos R64 (1), I114 (2), D122 (3), L137 (4), Q145 (5), E167 (6), R197 (7), K268 (8), K282 (9), e G286 (10). As letras representam duas orientações: a entrada do sítio ativo para o substrato (A) e o lado reverso da enzima (B). Modificado de Walraven *et al*, 2008.

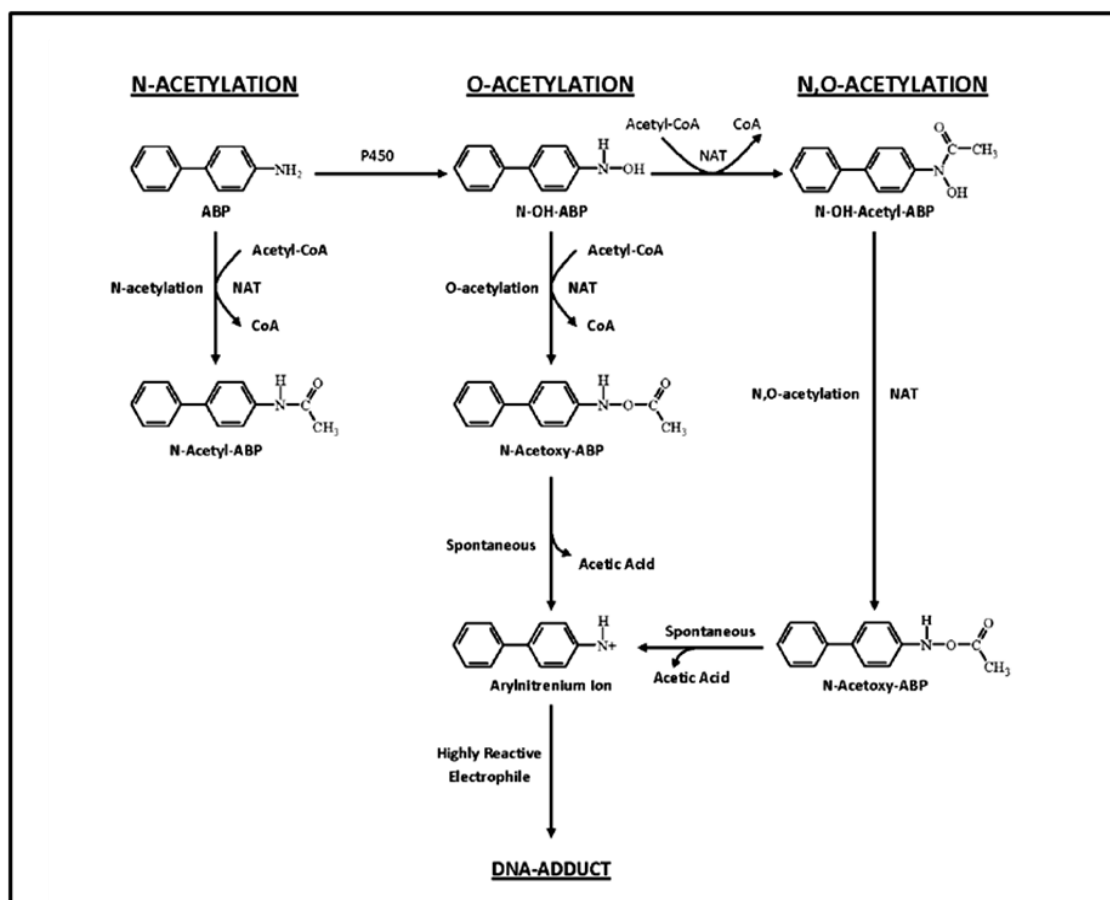


Fig. 4. Metabolismo de arilaminas catalisado pela NAT2.

Observa-se a ativação e inativação via N-acetilação, O-acetilação e N,O-acetilação. Modificado de Walraven, 2008.

Além da metabolização de algumas aminas aromáticas e drogas hidrazinas (Weber e Hein, 1985), a NAT2 pode modificar a predisposição a cânceres com o papel na bioativação e detoxificação de carcinógenos aromáticos e aminas heterocíclicas (Hein *et al.*, 2000).

A NAT2 é uma enzima que pode apresentar diferentes perfis de atividades catalíticas, definidas como acetilação lenta ou rápida. Essas diferenças podem ser caracterizadas devido à: i. diminuição da atividade proteica (Zang *et al.*, 2007), ii. redução na quantidade de proteína expressa (Deguchi, 1992; Grant *et al.*, 1997; Zang *et al.*, 2004) e iii. afinidade pelo substrato (Zang *et al.*, 2007). Essas variações ocorrem naturalmente entre indivíduos e são ocasionadas pela variabilidade genética. A variabilidade fenotípica da proteína NAT2 foi primeiramente identificada como uma modificação nos efeitos tóxicos em pacientes prescritos com a droga antituberculose Isoniazida (Weber e Hein, 1985).

A modificação na atividade enzimática ocorre devido a polimorfismos presentes no gene *NAT2*. Esses polimorfismos estão associados à presença de diferentes alelos para este gene. Estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado uma relação entre os alelos do *NAT2* e o risco individual para diversos cânceres como o de bexiga, colorretal, mama, próstata, pâncreas, pulmão (Badawi *et al.*, 1995; Brockton *et al.*, 2000).

2.5.1 Fenótipos do *NAT2*

Os alelos de *NAT2* são caracterizados por haplótipos determinados com base na combinação dos polimorfismos de nucleotídeo único SNPs. Diferentes alelos já foram identificados para o gene *NAT2*. O *NAT2*4* é considerado como o alelo/haplótipo “selvagem” por não conter SNPs. Os demais haplótipos são determinados com base na fase de ligação, ou seja, quando os SNPs são segregados em bloco em um mesmo cromossomo.

A inferência dos fenótipos *NAT2* é determinada com base na expressão co-dominante dos alelos/haplótipos de acetiladores rápidos ou lentos. Indivíduos homozigotos para os alelos de *NAT2* que codifica para a NAT2 com atividade de acetilação lenta são denominados acetiladores lento. Indivíduos homozigotos para alelos de *NAT2* que codifica para a NAT2 com atividade de acetilação rápida são denominados acetiladores rápidos. Por fim, os indivíduos que possuem um alelo rápido e um alelo lento são denominados acetiladores intermediários (Hein, 2006). Os efeitos dos alelos/haplótipos são resumidos na Tabela 1.

2.5.2 Genótipos de *NAT2*

Em humanos, o gene *N-acetiltransferase 2* está localizado no braço curto do cromossomo 8 região 8p21.3-23.1; possui 870 pares de bases e é destituído de íntrons. O

NAT2 codifica uma proteína de 290 aminoácidos (Brockton *et al.*, 2000). Os diversos SNPs para o gene *NAT2* têm sido investigados individualmente como modificadores na função da *NAT2*, como descritos na Tabela 1. Os SNPS C190T (R64W), G191A (R64Q), T341C (I114T), A434C (Q145P) e G590A (R197Q) são associados com a redução na atividade catalítica de N- e O-acetiltransferase, enquanto que T111C (F37F), C282T (Y94Y), C481T (L161L), C759T (V253V), e A803G (K268R) não são associados com a redução na atividade enzimática (Walraven *et al.*, 2008).

Tabela 1. Sumário dos efeitos dos SNPs. Observa-se influencia na atividade catalítica, níveis de expressão protéica e estabilidade intrínseca da proteína. Modificado de Hein, 2002.

| SNP | Troca aminoacídica | Expressão da proteína NAT2 | Estabilidade da Proteína NAT2 |
|-------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|
| T111C | nenhuma | +++ | +++ |
| C190T | R64W | + | + |
| G191A | R64Q | ++ | + |
| C282T | nenhuma | +++ | +++ |
| T341C | I114T | + | +++ |
| A434C | E145P | + | +++ |
| C481T | nenhuma | +++ | +++ |
| G590A | R197Q | + | + |
| G759T | nenhuma | +++ | +++ |
| A803G | K268R | +++ | +++ |
| A845C | K282T | +++ | + |
| G857A | G286E | +++ | + |

2.6 X-Ray Repair Cross Complementary 1

O gene *X-Ray Repair Cross Complementary 1 (XRCC1)* humano está localizado no cromossomo 19q13.2 e possui 17 exons; codifica uma enzima de mesmo nome com 633 aminoácidos e 70 kDa. Esta proteína é essencial para o reparo de quebra de fita simples no DNA e reparo por excisão de base (Ginsberg *et al.*, 2011). A XRCC1 auxilia no ancoramento de outras proteínas facilitando o recrutamento de enzimas de reparo a danos no DNA (Hiyama *et al.*, 2008). Esta enzima interage fisicamente com a DNA Polimerase β endonuclease I e hOGG1 (Hung *et al.*, 2005). Cerca de 60 SNPs já foram identificados e o mais extensamente estudados são Arg399Gln no éxon 10 (G-A), Arg194Trp no éxon 6 (C-T), e Arg280His no éxon 9 (G-A) (Ginsberg *et al.*, 2011). Embora as características bioquímicas e biológicas das

variantes não sejam completamente esclarecidas, tem sido relatado que indivíduos com a variante XRCC1 399Gln mostraram um aumento nas trocas de cromátides irmãs após tratamento com carcinógenos específicos de tabaco (Hiyama *et al.*, 2008). Polimorfismos nesse gene podem alterar sua expressão ou função, constituindo possíveis modificadores de risco para os diversos tipos de cânceres associados ao consumo de tabaco, a exemplo do CVAS. Diversos estudos de associação têm relacionado o polimorfismo de Arg399Gln do XRCC1 com alguns tipos de cânceres dentre eles os relacionados com tabagismo (Hung *et al.*, 2005).

2.7 8-Oxoguanine Glycosylase 1

O gene *8-Oxoguanine Glycosylase 1 (hOGG1)* está localizado na região cromossomal 3p25 e codifica duas formas de proteínas hOGG1 resultantes do *splicing* alternativo do RNA mensageiro. A proteína α hOGG1 é direcionada para o núcleo da célula, enquanto a β hOGG1 possui um sinal mitocondrial (Boiteux e Radicella, 2000). A hOGG1 é uma glicosilase e envolvida no reparo a danos no DNA do tipo 7,8-Dihydro-8-oxoguanine (8-OHdG) (Collins, 2007). A 8-OHdG é uma das mais abundantes lesões mutagênicas que pode ocorrer como consequência da oxidação de radicais livres (Weeins, 2005), radiação ionizante, compostos químicos genotóxicos e produtos do metabolismo celular normal (Boiteux, 2000).

A hOGG1 participa de uma curta via de reparo por excisão de base juntamente com algumas outras enzimas (Figura 5). A hOGG1 remove as bases danificadas (8-OHdG), posteriormente uma endonuclease I reconhece e cliva sítio com a base faltante, introduzindo uma quebra na fita de DNA; a proteína XRCC1 forma um ancoramento para polimerase β (Pol β) e ligase III (LIG3) no sítio a ser reparado (Weins, 2005).

Alguns polimorfismos já foram descritos para o gene *hOGG1* como Ala85Ser, Gly308Glu e Ser326Cys e podem estar associados a alterações na atividade catalítica da enzima. Um polimorfismo bastante estudado e associado a diversos tipos de cânceres é o que ocorre no códon 326 é resultante da substituição C-T na posição 1245 no éxon 7 envolvendo a substituição de uma serina por uma cisteína (Boiteux e Radicella, 2000).

Variações polimórficas em genes envolvidos com o reparo a danos no DNA podem ter um impacto na função proteica e consequente capacidade de reparo e isso pode levar ao aumento no risco de carcinogênese. Alguns estudos epidemiológicos evidenciam associação desses polimorfismos e o risco de câncer de esôfago, pulmão, nasofaríngeo e laringe (Weiss *et al.*, 2005).

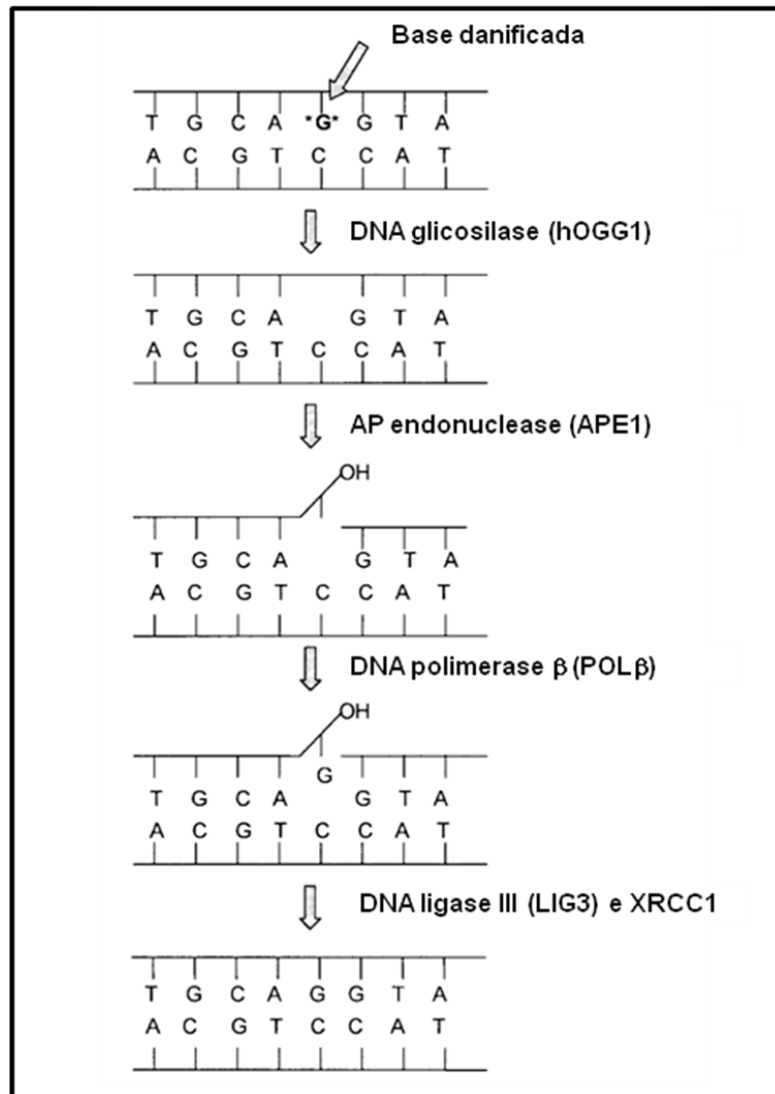


Figura 5. Esquema do reparo por excisão de base. Neste esquema é observado a participação das enzimas hOGG1 e XRCC1. Extraído de Weins *et al*, 2005.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Analisar a associação dos polimorfismos nos genes *NAT2*, *XRCC1* e *hOGG1* com o risco e progressão do carcinoma das vias aerodigestivas na região sul da Bahia.

3.2 Específicos

- Verificar a frequência populacional para os SNPs C190T, G191A, C282T, T341C, G363A, A411T, A434C, C481T, G499A, G590A, C759T, A803G, A845C e G857A para o gene *NAT2* e verificar a associação individual desses SNPs com o risco de CVAS;
- Analisar a associação dos SNPs do *XRCC1* e *hOGG1* com o risco de CVAS;
- Estabelecer o perfil de acetilação com base na combinação haplotípica dos SNPs polimórficos para o gene *NAT2*;
- Avaliar a influência do gene *NAT2*, *XRCC1* e *hOGG1* na progressão clínica do CVAS e diferentes parâmetros clinicopatológicos de doença.
- Avaliar a interação gene-ambiente (tabagismo e etilismo) e gene-gene para o desenvolvimento de CVAS;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos da Pesquisa

Os indivíduos participantes desta pesquisa foram agrupados em Casos e Controles. Todos possuem idade superior a 18 anos e foram informados sobre a natureza e objetivo da pesquisa e, após concordarem em participar do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). O Termo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UESC com número do parecer 628. Também foram obtidas informações como idade, sexo, cor da pele autodeclarada, dados sócio-econômicos e hábitos de vida, como tabagismo e etilismo que foram dispostos em um questionário (Anexo 2).

Quanto ao tabagismo, as informações obtidas referentes à quantidade de cigarro por dia e tempo de fumo (anos) foram utilizadas para classificação em três grupos distintos quanto ao status de tabagismo. Sempre fumantes são os indivíduos que relataram consumir pelo menos um cigarro por dia durante o período mínimo de um ano, nunca fumantes aqueles não enquadrados nesse critério. O grupo de sempre fumantes foi subdividido em fumantes moderados (maços-ano ≤ 20) e pesados (maços-ano > 20) com base nos valores de maços-ano. Cálculos de maços-ano foram realizados multiplicando-se o número de maços de cigarro consumidos por dia pelo tempo total de exposição em anos (1 maços-ano equivale ao consumo de um maço de cigarros por dia durante o período de um ano).

Quanto ao etilismo, os indivíduos foram agrupados como sempre etilistas ou nunca etilistas (definidos como aqueles indivíduos que relataram ingerir bebidas alcoólicas com uma frequência igual ou superior a duas vezes na semana e por um período mínimo de um ano).

4.1.1 Casos

Os pacientes com diagnóstico anatomopatológico confirmado para carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores foram recrutados na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) da Santa Casa de Misericórdia Itabuna, como também na Clínica Oncológica de Ilhéus (CLIONI), localizada no município de Ilhéus, BA. Os dados clínicos anatomopatológicos como tamanho do tumor, presença de metástase para linfonodos regionais, metástase à distância, grau histológico e estadiamento foram obtidos através do prontuário de cada paciente. O tamanho do tumor (T1, T2, T3 e T4) foi agrupado em duas categorias: $\leq 2\text{cm}$ (T1+T2) e $> 2\text{cm}$ (T3+T4). O Grau histológico foi subdividido em três classes: G1 (carcinoma bem diferenciado), G2 (carcinoma moderadamente diferenciado)

e G3 (carcinoma pouco diferenciado). O estadiamento (TNM) foi agrupado em duas classes: I+II (doença inicial) e III+IV (doença localmente avançada não-metastática)

4.1.2 Controles

Controles saudáveis, para essa neoplasia, foram recrutados no Banco de Sangue de Ilhéus e em laboratórios de anatomia patológica situados no município de Itabuna durante realização de exames de rotina não relacionados a câncer. Controles de base populacional foram convocados durante a realização de eventos públicos promovidos pela secretaria de saúde do município de Itabuna. Foram recrutados apenas indivíduos com ausência de história prévia de neoplasias malignas.

4.2 Material biológico

Após coletado 3mL de sangue periférico por punção venosa, o material biológico foi submetido à extração de DNA no Laboratório de Farmacogenômica e Epidemiologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA. Os reagentes e protocolo utilizados foram obtidos do Kit Quiagen Flexigene®. Após a extração, o DNA foi armazenado em “freezer” a -20°C .

4.3 Genotipagem do gene NAT2

4.3.1 PCR para o gene NAT2

Para um volume final de 25 μL de reação, foi utilizado tampão 10X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4); MgCl_2 1,5 mM; dNTPs 2 mM; 1,25 U de AmpliTaq DNA polimerase, cerca de 100ng de DNA genômico e 10pmol dos primers NAT2 externo direto 5' AAAAGGGATTCATGCAGTAGA 3' e NAT2 externo reverso 5' AAATAACGTGAGGGTAGAGAGG 3'. Ambos os primers, foram desenhados pelo grupo de pesquisa. O ciclo de amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi: $95^{\circ}\text{C}/5\text{min}$, seguido de 30 ciclos de $94^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, $57^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ e $72^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, com um ciclo final de extensão a $72^{\circ}\text{C}/5\text{min}$. Após a reação de amplificação, 5 μL do produto da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed a 95V por 25 minutos para posterior visualização com luz UV utilizando o fotodocumentador Kodak ESDA 290.

4.3.2 Sequenciamento do gene NAT2

Após amplificação, os produtos de PCR (1 a 3 μ L) foram purificados em sistema QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN® Spin Columns. Os oligonucleotídeos sintéticos internos e externos utilizados na reação de sequenciamento encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos sintéticos para o gene NAT2. Todos foram utilizados para o sequenciamento.

| Oligonucleotídeos Sintéticos | Sequência (5'→3') |
|------------------------------|------------------------|
| NAT2 externo direto | AAAAGGGATTCATGCAGTAGA |
| NAT2 externo reverso | AAATAACGTGAGGGTAGAGAGG |
| NAT2 interno direto | GTTAACAAATACAGCACTGGCA |
| NAT2 interno reverso | TGCCAGTGCTGTATTTGTTAAC |

As condições de preparo do pré-mix e ciclagem encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 3 e 4. As amostras foram posteriormente submetidas ao sequenciador Megabace.

Tabela 3. Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

| Reagente | Volume (μ L) |
|------------------|-------------------|
| Pré-Mix (BigDye) | 3 |
| H ₂ O | 10 |
| Primer | 1 |
| Amplicon | 1 |

Tabela 4. Condições da reação de sequenciamento.

| Temperatura | Tempo | Ciclos |
|-------------|-------|--------|
| 94°C | 3' | 1 |
| 94°C | 20" | |
| 57°C | 15" | 30 |
| 60°C | 1' | |

Os resultados dos eletroferograma foram analisados através do Software DNASTAR Lasergene Seqman (Figura 6). Primeiramente foi realizado o alinhamento das sequências com base numa sequência referência do gene NAT2 extraída do NCBI. Em seguida, foi analisada a posição do nucleotídeo referente a cada SNP. Cada amostra possui pelo menos duas sequências para cada SNP, devido à utilização de quatro primers na reação de sequenciamento, o que permitiu uma maior confiabilidade nos resultados dos genótipos. Todas as amostras tiveram seus genótipos (informado pelo Software) conferidos com seus

respectivos cromatogramas, para evitar possíveis erros de leitura dos picos de sequenciamento pelo Software.

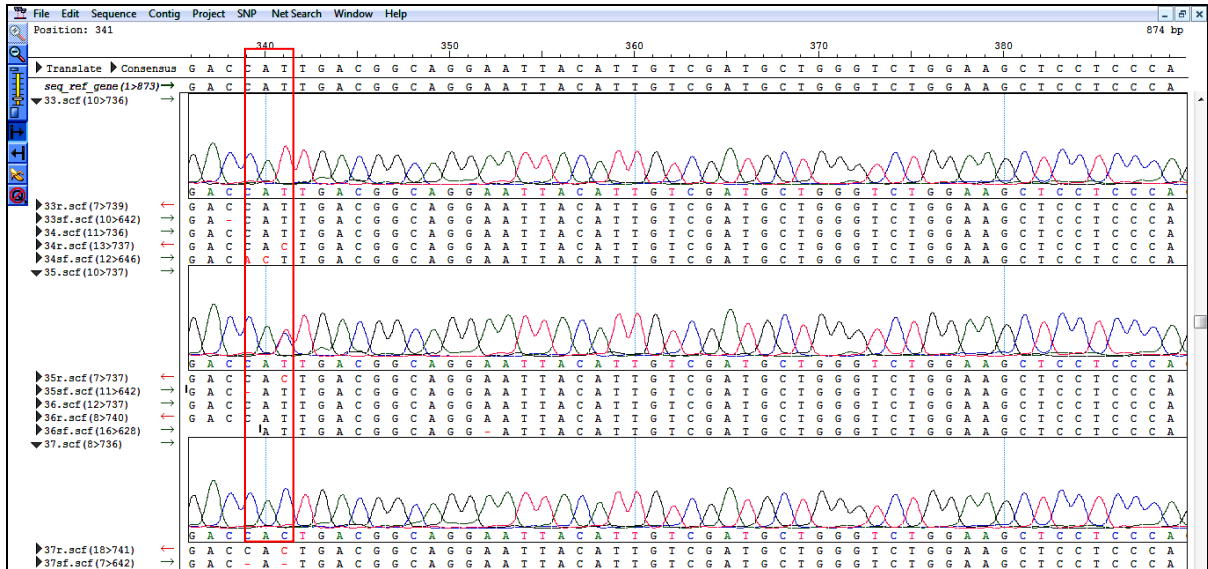


Figura 6. Resultado do alinhamento dos eletroferogramas para NAT2. Em destaque encontra-se os resultados dos cromatogramas para 3 genótipos distintos do SNP T341C. Amostra 33 = TT, 35=T/C e 37 = CC.

4.4. Genotipagem do polimorfismo Arg399Gln no XRCC1

4.4.1 PCR para o gene XRCC1

Para um volume final de 25 µl de reação, foi utilizado tampão 10X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4); MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 2 mM; 1,0U de AmpliTaq DNA polimerase, cerca de 100ng de DNA genômico e 15pmol dos primers F 5'GGACTGTCACCGCATGCGTCGG3' e R 5'GGCTGGGACCACCTGTGTT3'. O ciclo de amplificação foi: 95°C/5min, seguido de 30 ciclos de 94°C/60s, 55°C/60s, 72°C/60s e, com um ciclo final de extensão a 72°C/5min. Após a reação de amplificação, 5 µl do produto da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed a 95Voltz por 25 minutos para posterior visualização com luz UV utilizando o fotodocumentador Kodak ESDA 290.

4.4.2 RFLP para o gene XRCC1

Após amplificação, 20uL do produto de PCR foi digerido com 1U da endonucleases de restrição MSPI a 37°C por 12 horas. Após a reação restrição de, 10uL do produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed a 95Voltz por 45 minutos para posterior visualização com luz UV utilizando o fotodocumentador Kodak ESDA 290. Os genótipos foram obtidos com base no tamanho dos fragmentos após restrição. Na visualização do gel é possível observar 3 genótipos distintos (Fig 7). Nos genótipos homozigotos dominantes (Arg399Arg) foram obtidos os fragmentos de 115pb e 34pb. Para os genótipos homozigotos recessivos (Arg399Gln) foi obtido um fragmento de 149pb. Para os genótipos heterozigotos foram obtidos os fragmentos de 149pb, 115pb e 34pb.

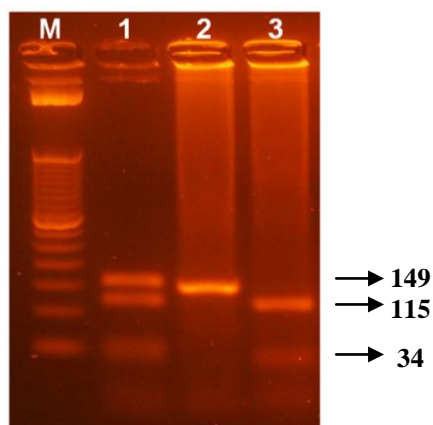


Figura 7. Gel de eletroforese para PCR-RFLP do gene XRCC1. Pode-se observar o marcador de peso molecular de 50pb e as amostras 1 (heterozigoto), 2 (homozigoto recessivos) e 3 (homozigoto dominante).

4.5. Genotipagem do polimorfismo Ser326Cys no gene hOGG1

4.5.1 PCR para o gene hOGG1

Para um volume final de 25 µl de reação, foi utilizado tampão 10X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4); MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 2 mM; 1,0U de AmpliTaq DNA polimerase , cerca de 100ng de DNA genômico e 15pmol dos primers F 5'CTGTTCAAGTGCCGACCTGCGCCGA3' e R 5'ATCTTGTTGTGCAAACACTGAC3' segundo Arizono *et al*, 2008, o *primer* Forward possui a troca de uma base para criar o sítio de restrição para a enzima MboI no alelo selvagem. O ciclo de amplificação foi: 95°C/5min,

seguido de 30 ciclos de 94°C/60s, 55°C/60s, 72°C/60s e, com um ciclo final de extensão a 72°C/5min. Após a reação de amplificação, 5 µl do produto da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed a 95VOLT por 25 minutos para posterior visualização com luz UV utilizando o fotodocumentador Kodak ESDA 290.

4.5.2 RFLP para o gene hOGG1

Após amplificação, 20uL do produto de PCR foi digerido com 1U da endonucleases de restrição MboI a 37°C por 12 horas. Após a reação de restrição, 10uL do produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed a 95VOLT por 45 minutos para posterior visualização com luz UV utilizando o fotodocumentador Kodak ESDA 290. Os genótipos foram obtidos com base no tamanho dos fragmentos após restrição. Na visualização do gel é possível observar 3 genótipos distintos (Figura 8). Nos genótipos homozigotos dominantes (Ser326Ser) foram obtidos os fragmentos de 224pb e 23pb. Para os genótipos homozigotos recessivos (Cys326Cys) foi obtido um fragmento de 247pb. Para os genótipos heterozigotos foram obtidos os fragmentos de (Ser326Cys) 247pb, 224pb e 23pb.

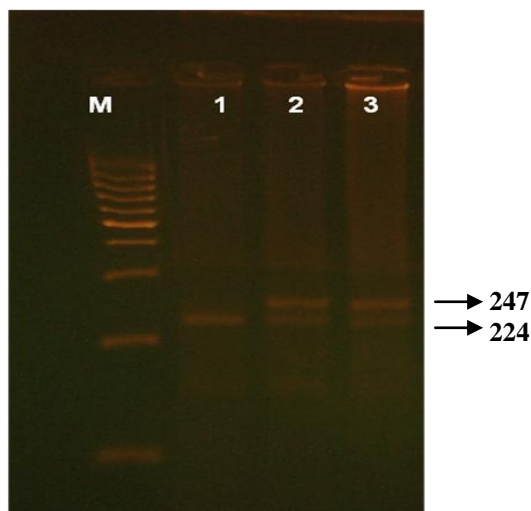


Figura 8. Gel de eletroforese para PCR-RFLP do gene XRCC1. Pode-se observar o marcador de peso molecular de 100pb e as amostras 1 (selvagem), 2 e 3 (heterozigoto).

4.4 Análises Estatísticas

Para avaliar diferenças de frequências genótípicas, haplotípicas, fenotípicas e alélicas entre casos e controles foram realizados testes de homogeneidade usando a estatística de χ^2 . O

Teste Exato de Fisher foi aplicado com a mesma finalidade quando o valor esperado para uma das células da Tabela de contingência foi inferior a 5. Cálculos de *Odds Ratio* (OR) com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95) foram obtidos para estimar o risco de CVAS associado aos diferentes fatores de exposição genéticos e ambientais estudados. Um modelo de regressão logística condicional foi aplicado para avaliar o risco de CVAS atribuído aos polimorfismos de *NAT2* após ajustes para sexo, cor da pele, idade, tabagismo e etilismo. Testes de independência entre os diferentes perfis de acetilação de *NAT2* e variáveis clinicopatológicas (estadiamento, grau histológico, tamanho do tumor e presença de linfonodos positivos) foram conduzidos para a coorte dos casos através de χ^2 e do Teste Exato de Fisher, quando necessário. As frequências genótípicas observadas para os SNPs de *NAT2* foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) entre casos e controles. As fases gaméticas de ligação dos SNPs e as frequências haplotípicas de *NAT2* foram estimadas utilizando os algoritmos ELB e EM, respectivamente, através do software Arlequin ver. 3.1 (Berna, Suíça). Análises de interação gene – ambiente foram conduzidas a partir de variáveis estratificadas (genótipo x tabagismo) que foram introduzidas em modelos de regressão logística com outras variáveis selecionadas. Para testar a significância das interações observadas aplicou-se um teste de razão de verossimilhanças usando a distribuição de χ^2 . Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico SPSS versão 10.0 (SPSS, Chicago, Illinois) adotando-se um nível de significância de 5% ($\alpha= 0,05$).

5. RESULTADOS

As características gerais de casos e controles são descritas na Tabela 5. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos com relação ao sexo e à cor da pele auto-declarada. A média de idade dos casos (60,9) foi semelhante à observada para os controles (60,1). Indivíduos classificados como sempre etilistas apresentaram um risco 3,64 vezes maior de desenvolver CVAS comparativamente aos nunca etilistas. O fumo também foi significativamente associado a esse tipo de câncer, com um risco 13,40 vezes maior de doença observado entre os sempre fumantes. Além disso, um efeito de interação aditivo foi verificado entre o tabagismo e o etilismo na elevação do risco de CVAS. A OR resultante da exposição simultânea a esses dois fatores (15,84) foi semelhante ao obtido pela soma dos valores de OR observados para cada variável independentemente (17,04). A quantidade de cigarros consumidos também foi significativamente associada ao risco desse tipo de câncer, com um risco de 9,16 para indivíduos que relataram consumir até 20 maços-ano e um risco de 17,0 para indivíduos que relataram consumir mais de 20 maços-ano.

Com relação ao sítio anatômico primário do tumor, verificou-se uma predominância de casos de CVAS com tumores de orofaringe (31,6%), seguidos pelos de laringe (29,6%) e cavidade oral (26,5%). Os tumores de hipofaringe corresponderam a 10,2% do total, enquanto que o tumor de hipofaringe foi verificado para um único caso (1%). Para um dos casos (1%) o sítio anatômico primário não pôde ser determinado (tumor primário oculto). Nenhum dos pacientes apresentou metástases a distância.

Quanto ao estadiamento, a maioria dos pacientes (88,9%) foi diagnosticada com doença localmente avançada não metastática (estádios II e IV), enquanto que apenas 11,1% apresentaram ao diagnóstico doença em estágio inicial (estádios I e II).

Tabela 5 – Características demográficas e hábitos de vida entre casos e controles.

| Variáveis | Casos (n = 116) | Controles (n = 182) | OR (IC 95%) | pValor |
|--------------------------|-----------------|---------------------|----------------------|--------|
| Gênero n (%) | | | – | – |
| Masculino | 100 (86,2) | 158 (86,8) | | |
| Feminino | 16 (13,8) | 24 (13,2) | | |
| Idade (média +DP) | 60,9 ± 12,5 | 60,1 ± 11,02 | – | – |
| Cor da Pele n (%) | | | | |
| Branco | 17 (14,7) | 27 (14,8) | | |
| Não Branco | 99 (85,3) | 155 (85,2) | | |
| Etilismo n (%) | | | | |
| Nunca | 27 (23,3) | 85 (52,5) | Ref. | |
| Sempre | 89 (76,7) | 77 (47,5) | 3,64 (2,14 - 6,18) | <0,001 |
| Tabagismo n (%) | | | | |
| Nunca | 6 (5,2) | 76 (42,2) | Ref. | |
| Sempre | 110 (94,8) | 104 (57,8) | 13,40 (5,60 - 32,08) | <0,001 |
| Maços-ano | | | | |
| 0 | 6 (6,3) | 76 (46,3) | Ref. | |
| <20 | 34 (35,8) | 47 (28,7) | 9,16 (3,57 - 23,48) | <0,001 |
| >20 | 55 (57,9) | 41 (25,0) | 17,00 (6,74 - 42,81) | <0,001 |
| Tabagismo/Etilismo n (%) | | | | |
| Nunca/Nunca | 5 (4,3) | 54 (33,5) | Ref. | |
| Sempre/Nunca | 22 (19,0) | 31 (19,3) | 7,66 (2,63 - 22,27) | <0,001 |
| Nunca/Sempre | 1 (0,9) | 16 (9,9) | 0,67 (0,07 - 6,20) | 1 |
| Sempre/Sempre | 88 (75,9) | 60 (37,3) | 15,84 (5,96 - 41,91) | <0,001 |

Na Tabela 6 são descritas as frequências genóticas e alélicas dos SNPs G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G e G857A avaliados entre casos e controles. Para todos os SNPs considerados não foram verificadas diferenças significantes de frequências alélicas entre os grupos ($p > 0,05$). Aplicando-se um modelo multiplicativo de doença, também não foi observada nenhuma associação significativa entre os referidos SNPs e o risco de CVAS. Para as frequências genóticas foi verificada uma associação apenas para o SNP A803G (OR: 0,44; IC 95%: 0,24 – 0,82; $p = 0,01$).

Tabela 6. Distribuição de frequências genótípicas e alélicas para o NAT2. São descritos os SNPs polimórficos analisados entre casos e controles.

| SNP | Casos n (%) | Controles n (%) | OR (IC 95%) | pValor |
|----------------|-------------|-----------------|--------------------|-------------|
| 191 G/A | | | | |
| GG | 103 (92,8) | 156 (93,4) | Ref. | – |
| GA | 8 (7,2) | 10 (6,0) | 1,21 (0,46 - 3,17) | 0,695 |
| AA | 0 (0,0) | 1 (0,6) | – | 1 |
| G | 188 (96,9) | 204 (96,2) | Ref. | – |
| A | 6 (3,1) | 8 (3,8) | 0,81 (0,28 - 2,39) | 0,707 |
| 282 C/T | | | | |
| CC | 48 (46,2) | 62 (49,2) | Ref. | – |
| CT | 46 (44,2) | 52 (41,3) | 1,14 (0,66 - 1,97) | 0,633 |
| TT | 10 (9,6) | 12 (9,5) | 1,07 (0,43 - 2,70) | 0,875 |
| C | 130 (67,0) | 139 (66,6) | Ref. | – |
| T | 64 (33,0) | 73 (34,4) | 0,94 (0,62 - 1,41) | 0,759 |
| 341 T/C | | | | |
| TT | 43 (38,7) | 67 (45,9) | Ref. | – |
| TC | 53 (47,7) | 64 (43,8) | 1,29 (0,76 - 2,19) | 0,344 |
| CC | 15 (13,5) | 15 (10,3) | 1,56 (0,69 - 3,51) | 0,282 |
| T | 121 (62,4) | 138 (65,1) | Ref. | – |
| C | 73 (37,6) | 74 (34,9) | 1,12 (0,75 - 1,67) | 0,568 |
| 481 C/T | | | | |
| CC | 48 (41,7) | 75 (42,1) | Ref. | – |
| CT | 55 (47,8) | 75 (42,1) | 1,14 (0,69 - 1,84) | 0,595 |
| TT | 12 (10,4) | 28 (15,7) | 0,67 (0,31 - 1,44) | 0,304 |
| C | 129 (66,5) | 130 (61,3) | Ref. | – |
| T | 65 (33,5) | 82 (38,7) | 0,80 (0,53 - 1,20) | 0,279 |
| 590 G/A | | | | |
| GG | 63 (54,3) | 71 (48,6) | Ref. | – |
| GA | 49 (42,2) | 70 (47,9) | 0,79 (0,48 - 1,30) | 0,351 |
| AA | 4 (3,4) | 5 (3,4) | 0,90 (0,23 - 3,50) | 1 |
| G | 148 (76,3) | 156 (73,6) | Ref. | – |
| A | 46 (23,7) | 56 (26,4) | 0,86 (0,55 - 1,36) | 0,53 |
| 803 A/G | | | | |
| AA | 37 (33,0) | 43 (26,1) | Ref. | – |
| AG | 48 (42,9) | 51 (30,9) | 1,09 (0,60 - 1,97) | 0,766 |
| GG | 27 (24,1) | 71 (43,0) | 0,44 (0,24 - 0,82) | 0,01 |
| A | 113 (58,2) | 109 (51,4) | Ref. | – |
| G | 81 (41,8) | 103 (48,6) | 0,76 (0,51 - 1,12) | 0,167 |
| 857 G/A | | | | |
| GG | 107 (94,7) | 156 (96,3) | Ref. | – |
| GA | 6 (5,3) | 6 (3,7) | 1,46 (0,46 - 4,64) | 0,521 |
| AA | 0 (0,0) | 0 (0,0) | – | – |
| G | 189 (97,4) | 208 (98,1) | Ref. | – |
| A | 5 (2,6) | 4 (1,9) | 1,37 (0,36 - 5,20) | 0,637 |

Na Tabela 7 são descritas as frequências e alélicas dos SNPs C190T, G363A, A411T, A434C, G499A, C759T e A845C avaliados entre casos e controles. Todos os 7 SNPs foram monomórficos para o alelo selvagem e por isso não foi realizada a análise de associação.

Tabela 7. Distribuição de frequências genotípicas e alélicas para o NAT2. Descrição dos SNPs monomórficos analisados entre casos e controles.

| SNP | Casos n (%) | Controles n (%) |
|----------------|-------------|-----------------|
| 190 C/T | | |
| C | 111 (100) | 169 (100) |
| T | 0 (0) | 0 (0) |
| 364 G/A | | |
| G | 115 (100) | 176 (100) |
| A | 0 (0) | 0 (0) |
| 411 A/T | | |
| A | 114 (100) | 177 (100) |
| T | 0 (0) | 0 (0) |
| 434 A/C | | |
| A | 114 (100) | 177 (100) |
| C | 0 (0) | 0 (0) |
| 499 G/A | | |
| G | 112 (100) | 176 (100) |
| A | 0 (0) | 0 (0) |
| 759 C/T | | |
| C | 116 (100) | 174 (100) |
| T | 0 (0) | 0 (0) |
| 845 A/C | | |
| A | 115 (100) | 175 (100) |
| C | 0 (0) | 0 (0) |

Na Tabela 8 são descritas as distribuições dos diferentes haplótipos de NAT2, com os respectivos alelos a que eles correspondem, entre casos e controles. Com exceção do alelo-haplótipo NAT2*4, os 12 primeiros alelos, na Tabela 8, conferem um fenótipo de N-acetilação lenta. Os alelos NAT2*7C e ND não têm efeito conhecido. Os últimos 6 alelos conferem perfil de N-acetilação rápida. Na análise de associação dos haplótipos com o risco de CVAS, houve diferença significativa entre casos e controles apenas para o haplótipo correspondente ao alelo NAT2*5C (OR: 4,31; IC 95%: 1,13 – 16,48; p = 0,023).

Tabela 8. Distribuição dos diferentes haplótipos para NAT2. Inferência com base nos SNPs 191 G/A, 282 C/T, 341 T/C, 481 C/T, 590 G/A, 803 A/G e 857 G/A de NAT2 entre casos e controles.

| Haplótipo | Alelo | Casos n(%) | Controles n(%) | OR (IC 95%) | pValor |
|-----------|----------|---------------|-------------------|---------------------|--------------|
| GCTCGAG | NAT2*4 | 38 (19,6) | 41 (19,3) | Ref. | – |
| ATTCGAG | NAT2*14B | 5 (2,6) | 4 (1,9) | 1,35 (0,34 - 5,40) | 0,736 |
| ACTCGAG | NAT2*14A | 1 (0,5) | 2 (0,9) | 0,54 (0,05 - 6,19) | 1 |
| GTTTAAG | NAT2*5J | 1 (0,5) | 0 (0,0) | – | 0,488 |
| GTTC AAG | NAT2*6A | 38 (19,6) | 49 (23,1) | 0,84 (0,45 - 1,54) | 0,568 |
| GTTCAGG | NAT2*6C | 4 (2,1) | 5 (2,4) | 0,86 (0,21 - 3,45) | 1 |
| GTTCGAA | NAT2*7B | 4 (2,1) | 4 (1,9) | 1,08 (0,25 - 4,62) | 1 |
| GCTCAAG | NAT2*6B | 3 (1,5) | 1 (0,5) | 3,24 (0,32 - 32,47) | 0,36 |
| GCCTGAG | NAT2*5A | 5 (2,6) | 0 (0,0) | – | 0,055 |
| GCCTGGG | NAT2*5B | 51 (26,3) | 70 (33,0) | 0,78 (0,44 - 1,39) | 0,408 |
| GCCCAAG | NAT2*5D | 4 (2,1) | 1 (0,5) | 4,31 (0,46 - 40,35) | 0,36 |
| GCCCGGG | NAT2*5C | 12 (6,2) | 3 (1,4) | 4,31 (1,13 - 16,48) | 0,023 |
| ATTCGGG | NAT2*14G | 0 (0,0) | 2 (0,9) | – | 0,496 |
| GTTCGGA | NAT2*7C | 1 (0,5) | 0 (0,0) | – | 0,488 |
| GTTTGAG | NI | 2 (1,0) | 0 (0,0) | – | 0,241 |
| GTTTGGG | NI | 0 (0,0) | 1 (0,5) | – | 1 |
| GTTCGAG | NAT2*13A | 9 (4,6) | 6 (2,8) | 1,62 (0,52 - 4,97) | 0,398 |
| GCTTGAG | NAT2*11A | 3 (1,5) | 1 (0,5) | 3,24 (0,32 - 32,47) | 0,36 |
| GCTTGGG | NAT2*12C | 3 (1,5) | 10 (4,7) | 0,32 (0,08 - 1,26) | 0,093 |
| GCTCGGG | NAT2*12A | 10 (5,2) | 10 (4,7) | 1,08 (0,40 - 2,88) | 0,879 |
| GTTCGGG | NAT2*12B | 0 (0,0) | 2 (0,9) | – | 0,496 |

NI Alelo não descrito na literatura.

Na Tabela 9 são descritas as análises de associação entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln, hOGG1 Ser326Cys e os fenótipos acetiladores de NAT2 com o risco de CVAS. Nessas análises o fenótipo acetilador rápido foi considerado o grupo referência (assumido como sendo o de menor risco). Não foram observadas diferenças significantes para a distribuição desses fenótipos entre casos e controles. Indivíduos classificados como acetiladores intermediários não apresentaram um risco estatisticamente diferente de desenvolvimento de CVAS em comparação aos acetiladores rápidos (OR: 1,06; IC 95%: 0,47 – 2,38; $p = 0,878$). Um resultado similar foi observado na comparação entre N-acetiladores lentos e rápidos (OR: 0,95; IC 95% 0,44 – 2,06; $p = 0,907$). Com relação ao polimorfismo XRCC1 Arg399Gln não foram observadas diferenças significantes de frequências genótípicas ou alélicas (modelo multiplicativo) entre casos e controles. Nenhuma associação foi verificada também quando um modelo genético dominante foi adotado (OR: 0,79; IC 95% 0,50 – 1,25; $p = 0,325$). Para o polimorfismo hOGG1Ser326Cys também não foram

observadas diferenças significantes entre casos e controles para nenhum dos modelos genéticos de doença considerados.

Tabela 9. Associação entre os polimorfismos XRCC1, hOGG1 e os fenótipos acetiladores de NAT2 com o risco de CVAS.

| Variáveis | Casos n (%) | Controles n (%) | OR (IC 95%) | pValor |
|----------------------------|-------------|-----------------|--------------------|--------|
| Fenótipo Acetilador | | | | |
| Rápido | 15 (14,9) | 19 (14,8) | Ref. | – |
| Intermediário | 37 (36,6) | 44 (34,4) | 1,06 (0,47 - 2,38) | 0,878 |
| Lento | 49 (48,5) | 65 (50,8) | 0,95 (0,44 - 2,06) | 0,907 |
| XRCC1 Arg399Gln | | | | |
| GG | 69 (59,0) | 112 (53,3) | Ref. | – |
| GA | 39 (33,3) | 86 (41,0) | 0,73 (0,45 - 1,19) | 0,213 |
| AA | 9 (7,7) | 12 (5,7) | 1,21 (0,48 - 3,04) | 0,673 |
| GA ou AA | 48 (41,0) | 98 (46,7) | 0,79 (0,50 - 1,25) | 0,325 |
| G | 177 (75,6) | 310 (73,8) | Ref. | – |
| A | 57 (24,4) | 110 (26,2) | 0,90 (0,63 - 1,31) | 0,607 |
| hOGG1 Ser326Cys | | | | |
| CC | 87 (74,4) | 137 (65,6) | Ref. | – |
| CG | 25 (21,4) | 62 (29,7) | 0,63 (0,37 - 1,06) | 0,096 |
| GG | 5 (4,2) | 10 (4,7) | 0,78 (0,26 - 2,38) | 0,671 |
| CG ou GG | 30 (25,6) | 72 (34,4) | 0,65 (0,39 - 1,06) | 0,1 |
| C | 199 (85,0) | 336 (80,4) | Ref. | – |
| G | 35 (15,0) | 82 (19,6) | 0,72 (0,46 - 1,11) | 0,137 |

Na Tabela 10 encontram-se os resultados da análise de regressão logística multivariada envolvendo diferentes variáveis de risco para o CVAS. Como descrito na Tabela, quando ajustadas para o impacto de outras variáveis de interesse as associações entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln e hOGG1 Ser326Cys com o risco de CVAS permaneceram estatisticamente não significantes (OR: 0,69; IC 95% 0,4 - 1,2; p = 0,194 e OR: 0,64; IC 95% 0,35 - 1,16; p = 0,142, respectivamente). Um mesmo resultado foi observado em relação ao gene NAT2. Para o fenótipo acetilador intermediário a OR ajustada foi de 1,44 (IC 95%: 0,53 - 3,94; p = 0,474), enquanto que para o fenótipo acetilador lento a OR ajustada foi de 1,12 (IC 95%: 0,43 - 2,94; p = 0,808).

Tabela 10. Modelo de regressão logística multivariada dos fatores de risco para o CVAS.

| Variáveis | OR (IC 95%) | pValor |
|-----------------------------------|----------------------|--------|
| Idade | 1,0 (0,97 - 1,03) | 0,798 |
| Acetilador Intermediário | 1,44 (0,53 - 3,94) | 0,474 |
| Acetilador Lento | 1,12 (0,43 - 2,94) | 0,808 |
| XRCC1 Arg399Gln mut. ^a | 0,69 (0,4 - 1,2) | 0,194 |
| hOGG1 Ser326Cys mut. ^b | 0,64 (0,35 - 1,16) | 0,142 |
| Sexo | 0,16 (0,04 - 0,62) | 0,008 |
| Cor da Pele | 0,84 (0,34 - 2,06) | 0,702 |
| Tabagismo | 12,59 (4,14 - 38,31) | <0,001 |
| Etilismo | 1,99 (0,94 - 4,23) | 0,073 |

^a GA ou AA
^b CG ou GG

Na Tabela 11 são descritas análises de interação entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln, hOGG1 Ser326Cys e os fenótipos acetiladores de NAT2 com o tabagismo na modulação do risco de CVAS. Como forma de aumentar o poder estatístico das análises os fenótipos rápido e intermediário foram agrupados em uma mesma categoria, assumida como o grupo referência. O fenótipo acetilador lento não foi significativamente associado ao risco de CVAS para nenhuma das categorias de fumantes consideradas. Esses resultados permaneceram não significantes após ajustes para outras variáveis de risco pela aplicação de um modelo de regressão logística multivariada. Em suma, não foi verificado um efeito de interação significativa entre os fenótipos de NAT2 e o tabagismo na modificação do risco de CVAS. Também não foi observado um efeito de interação significativa entre o polimorfismo Arg399Gln de XRCC1 e o consumo de tabaco na modulação do risco de CVAS. Contudo, considerando um modelo genético dominante o polimorfismo Ser326Cys de hOGG1 foi um fator de proteção para o desenvolvimento CVAS entre os fumantes moderados (OR: 0,35; IC 95% 0,12 - 0,99; $p = 0,044$), mas não entre os fumantes pesados e os nunca fumantes. Esse resultado foi confirmado após ajustes para outras variáveis de interesse pelo modelo de regressão logística multivariada (OR: 0,31; IC 95% 0,1 - 0,98; $p = 0,048$). Quando o modelo multiplicativo foi adotado para o grupo de fumantes moderados verificou-se uma menor frequência do alelo mutante de hOGG1 Ser326Cys (alelo G) entre os casos (10%) comparativamente ao controles (20,4%). No entanto, essa diferença não chegou a alcançar significância estatística (OR: 0,43; IC 95% 0,17 - 1,06; $p = 0,067$).

Tabela 11. Associações estratificadas por categorias de fumantes entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln, hOGG1Ser326Cys e os fenótipos acetiladores de NAT2 com o risco de CVAS.

| Variáveis | Casos n (%) | Controles n (%) | OR ^a (IC 95%) | pValor | OR ^b (IC 95%) | pValor |
|----------------------------|-------------|-----------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| Nunca fumantes | | | | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | | | | | | |
| Rápido ou Intermediário | 2 (40,0) | 25 (48,1) | Ref. | – | | |
| Lento | 3 (60,0) | 27 (51,9) | 1,39 (0,21 - 9,01) | 1 | 1,62 (0,19 - 14,03) | 0,66 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | | | |
| GG | 5 (83,3) | 51 (53,7) | Ref. | – | | |
| GA ou AA | 1 (16,7) | 44 (46,3) | 0,23 (0,02 - 2,06) | 0,222 | 0,20 (0,02 - 2,06) | 0,178 |
| G | 11 (91,7) | 143 (75,3) | Ref. | – | | |
| A | 1 (8,3) | 47 (24,7) | 0,27 (0,03 - 2,20) | 0,301 | | |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | | | |
| CC | 5 (83,3) | 61 (66,6) | Ref. | – | | |
| CG ou GG | 1 (16,7) | 32 (34,4) | 0,38 (0,04 - 3,40) | 0,66 | 0,31 (0,03 - 3,01) | 0,311 |
| C | 11 (91,7) | 149 (80,1) | Ref. | – | | |
| G | 1 (8,3) | 37 (19,9) | 0,36 (0,04 - 2,92) | 0,468 | | |
| ≤20 Maços-ano | | | | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | | | | | | |
| Rápido ou Intermediário | 17 (54,8) | 14 (48,3) | Ref. | – | | |
| Lento | 14 (45,2) | 15 (51,7) | 0,77 (0,28 - 2,12) | 0,611 | 0,81 (0,26 - 2,51) | 0,715 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | | | |
| GG | 20 (57,1) | 30 (56,6) | Ref. | – | | |
| GA ou AA | 15 (42,9) | 23 (43,4) | 0,98 (0,41 - 2,32) | 0,96 | 0,99 (0,38 - 2,56) | 0,995 |
| G | 53 (75,7) | 78 (73,6) | Ref. | – | | |
| A | 17 (24,3) | 28 (26,4) | 0,89 (0,44 - 1,79) | 0,751 | | |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | | | |
| CC | 29 (82,9) | 34 (63,0) | Ref. | – | | |
| CG ou GG | 6 (17,1) | 20 (37,0) | 0,35 (0,12 - 0,99) | 0,044 | 0,31 (0,1 - 0,98) | 0,048 |
| C | 63 (90,0) | 86 (79,6) | Ref. | – | | |
| G | 7 (10,0) | 22 (20,4) | 0,43 (0,17 - 1,06) | 0,067 | | |

>20 Maços-ano*Fenótipo Acetilador*

| | | | | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|---------------------|-------|--------------------|-------|
| Rápido ou Intermediário | 23 (54,8) | 14 (45,2) | Ref. | – | | |
| Lento | 19 (45,2) | 17 (54,8) | 0,68 (0,27 - 1,73) | 0,417 | 0,66 (0,23 - 1,84) | 0,425 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | | | |
| GG | 34 (61,8) | 19 (47,5) | Ref. | – | | |
| GA ou AA | 21 (38,2) | 21 (52,5) | 0,56 (0,24 - 1,27) | 0,165 | 0,57 (0,24 - 1,38) | 0,213 |
| G | 84 (76,4) | 55 (68,8) | Ref. | – | | |
| A | 26 (23,6) | 25 (31,3) | 0,68 (0,35 - 1,30) | 0,242 | | |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | | | |
| CC | 38 (69,1) | 25 (62,5) | Ref. | – | | |
| CG ou GG | 17 (30,9) | 15 (37,5) | 0,74 (0,31 - 1,76) | 0,502 | 0,86 (0,34 - 2,14) | 0,743 |
| C | 89 (80,9) | 63 (78,8) | Ref. | – | | |
| G | 21 (19,1) | 17 (21,3) | 0,87 (0,43 - 1,79) | 0,713 | | |

^a OR não ajustada^b OR ajustada para sexo, idade, etilismo e cor da pele pelo modelo de regressão logística multivariada

Na Tabela 12 são descritas análises de interação entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln, hOGG1 Ser326Cys e os fenótipos acetiladores de NAT2 com o etilismo na modulação do risco de CVAS. A exemplo do verificado para o tabagismo, o fenótipo acetilador lento não foi significativamente associado ao risco de CVAS para nenhuma das categorias de etilistas consideradas. Esses resultados permaneceram não significantes após ajustes para outras variáveis de risco pela aplicação de um modelo de regressão logística multivariada. Também nesse caso não foi verificado um efeito de interação significativa entre os fenótipos de NAT2 e o etilismo na modulação do risco de CVAS. Também não foi observado um efeito de interação significativa entre o polimorfismo Ser326Cys de hOGG1 e o hábito de etilismo na modificação do risco de CVAS.

O polimorfismo Arg399Gln de XRCC1, por sua vez, foi significativamente associado como um fator de proteção para o CVAS apenas entre os nunca etilistas adotando-se o modelo genético dominante (OR: 0,37; IC 95% 0,14 - 0,96; $p = 0,037$). Esse resultado permaneceu significativo após ajustes pelo modelo de regressão logística multivariada (OR: 0,30; IC 95% 0,09 - 0,94; $p = 0,039$). Considerado o modelo genético multiplicativo de doença observou-se que o alelo mutante de Arg399Gln de XRCC1 (alelo A) foi mais frequente entre os controles comparativamente aos casos no grupo dos nunca etilistas. Novamente, tal diferença não alcançou significância estatística (OR: 0,47; IC 95% 0,21 - 1,07; $p = 0,069$).

Tabela 12. Associações entre os fenótipos acetiladores de NAT2 e o risco de CVAS estratificadas por categorias de etilistas.

| Variáveis | Casos n (%) | Controles n (%) | OR ^a (IC 95%) | pValor | OR ^b (IC 95%) | pValor |
|----------------------------|-------------|-----------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| Nunca etilistas | | | | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | | | | | | |
| Rápido ou Intermediário | 13 (52,0) | 34 (57,6) | Ref. | – | | |
| Lento | 12 (48,0) | 25 (42,4) | 1,25 (0,49 - 3,21) | 0,635 | 1,33 (0,44 - 3,98) | 0,61 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | | | |
| GG | 20 (74,1) | 49 (51,6) | Ref. | – | | |
| GA ou AA | 7 (25,9) | 46 (48,4) | 0,37 (0,14 - 0,96) | 0,037 | 0,30 (0,09 - 0,94) | 0,039 |
| G | 46 (85,2) | 139 (73,2) | Ref. | – | | |
| A | 8 (14,8) | 51 (26,8) | 0,47 (0,21 - 1,07) | 0,069 | | |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | | | |
| CC | 20 (74,1) | 58 (61,1) | Ref. | – | | |
| CG ou GG | 7 (25,9) | 37 (38,9) | 0,55 (0,21 - 1,42) | 0,214 | 0,36 (0,12 - 1,08) | 0,07 |
| C | 46 (85,2) | 150 (78,9) | Ref. | – | | |
| G | 8 (14,8) | 40 (21,1) | 0,65 (0,28 - 1,49) | 0,309 | | |
| Sempre etilistas | | | | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | | | | | | |
| Rápido ou Intermediário | 38 (51,4) | 23 (41,8) | Ref. | – | | |
| Lento | 36 (46,6) | 32 (58,2) | 0,68 (0,34 - 1,37) | 0,283 | 0,77 (0,36 - 1,64) | 0,498 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | | | |
| GG | 49 (54,4) | 46 (53,5) | Ref. | – | | |
| GA ou AA | 41 (45,6) | 40 (46,5) | 0,96 (0,53 - 1,74) | 0,899 | 0,85 (0,45 - 1,62) | 0,628 |
| G | 131 (72,8) | 128 (74,4) | Ref. | – | | |
| A | 49 (27,2) | 44 (25,6) | 1,07 (0,67 - 1,75) | 0,727 | | |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | | | |
| CC | 67 (74,4) | 60 (69,8) | Ref. | – | | |
| CG ou GG | 23 (25,6) | 26 (30,2) | 0,79 (0,41 - 1,53) | 0,489 | 0,80 (0,39 - 1,65) | 0,549 |
| C | 153 (85) | 141 (82,0) | Ref. | – | | |
| G | 27 (15,0) | 31 (18,0) | 0,80 (0,45 - 1,41) | 0,445 | | |

^aOR não ajustada

^bOR ajustada para sexo, idade, tabagismo e cor da pele pelo modelo de regressão logística multivariada

Na Tabela 13 são descritas as associações entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln, hOGG1 Ser326Cys e os fenótipos acetiladores de NAT2 com os diferentes parâmetros clinicopatológicos avaliados. Nenhum dos fenótipos N-acetiladores foi significativamente associado com o estágio clínico, grau histológico do tumor, positividade de linfonodos regionais ou tamanho tumoral. Um resultado similar foi verificado para os polimorfismos dos genes de reparo aqui avaliados.

Na Tabela 14 são descritas análises de interação gene-gene considerando os diferentes polimorfismos de XRCC1, hOGG1 e os perfis de acetilação de NAT2. Na análise combinada de XRCC1 Arg399Gln e hOGG1 Ser326Cys foi verificado que indivíduos portadores de pelo menos um alelo mutante de ambos os polimorfismos apresentaram um risco de CVAS significativamente menor em comparação ao duplos selvagens (OR ajustada: 0,41; IC 95%: 0,18 - 0,93; $p = 0,033$). Nenhuma outra interação significativa foi observada em relação às combinações dos polimorfismos XRCC1 Arg399Gln e hOGG1 Ser326Cys com os diferentes perfis de acetilação de NAT2.

Tabela 13. Distribuição dos polimorfismos de XRCC1 e hOGG1 e fenótipos N-acetiladores entre os casos de CVAS de acordo com diferentes parâmetros clinicopatológicos.

| Variáveis | Parâmetros Clinicopatológicos | | OR (IC 95%) | pValor |
|----------------------------|--------------------------------|-----------|--------------------|--------|
| | Estadiamento UICC n (%) | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | I + II | III + IV | | |
| Rápido | 0 (0,0) | 13 (16,3) | Ref. | – |
| Intermediário | 6 (60) | 29 (36,3) | – | 0,171 |
| Lento | 4 (40) | 38 (47,5) | – | 0,562 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | |
| GG | 7 (63,6) | 52 (57,8) | Ref. | – |
| GA ou AA | 4 (36,4) | 38 (42,2) | 1,28 (0,35 - 4,68) | 0,759 |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | |
| CC | 7 (63,6) | 69 (76,7) | Ref. | – |
| CG ou GG | 4 (36,4) | 21 (23,3) | 0,53 (0,14 - 1,99) | 0,458 |
| | Grau Histológico n (%) | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | G1 | G2 + G3 | | |
| Rápido | 4 (12,9) | 8 (16,0) | Ref. | – |
| Intermediário | 10 (32,3) | 22 (44,0) | 1,10 (0,26 - 4,52) | 1 |
| Lento | 7 (54,8) | 20 (40,0) | 0,58 (0,15 - 2,30) | 0,443 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | |
| GG | 23 (69,7) | 34 (55,7) | Ref. | – |
| GA ou AA | 10 (30,3) | 27 (44,3) | 1,82 (0,74 - 4,48) | 0,186 |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | |
| CC | 23 (69,7) | 45 (73,8) | Ref. | – |
| CG ou GG | 10 (30,3) | 16 (26,2) | 0,82 (0,32 - 2,08) | 0,673 |
| | Linfonodos n (%) | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | Negativo | Positivo | | |
| Rápido | 2 (6,9) | 10 (20,4) | Ref. | – |
| Intermediário | 14 (48,3) | 18 (36,7) | 0,26 (0,48 - 1,37) | 0,16 |
| Lento | 13 (44,8) | 21 (42,9) | 0,32 (0,06 - 1,71) | 0,285 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | |
| GG | 23 (63,9) | 30 (55,6) | Ref. | – |
| GA ou AA | 13 (36,1) | 24 (44,4) | 1,41 (0,59 - 3,36) | 0,431 |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | |
| CC | 27 (75,0) | 41 (75,9) | Ref. | – |
| CG ou GG | 9 (25,0) | 13 (24,1) | 0,95 (0,36 - 2,53) | 0,92 |
| | Tamaho do tumor n (%) | | | |
| <i>Fenótipo Acetilador</i> | T1 + T2 | T3 + T4 | | |
| Rápido | 1 (7,7) | 10 (16,4) | Ref. | – |
| Intermediário | 7 (53,8) | 26 (42,6) | 0,37 (0,04 - 3,41) | 0,656 |
| Lento | 5 (38,5) | 25 (41,0) | 0,50 (0,05 - 4,83) | 1 |
| <i>XRCC1 Arg399Gln</i> | | | | |
| GG | 10 (58,8) | 39 (57,4) | Ref. | – |
| GA ou AA | 7 (41,2) | 29 (42,6) | 1,06 (0,36 - 3,12) | 0,913 |
| <i>hOGG1 Ser326Cys</i> | | | | |
| CC | 10 (58,8) | 53 (77,9) | Ref. | – |
| CG ou GG | 7 (41,2) | 15 (22,1) | 0,40 (0,13 - 1,24) | 0,128 |

Tabela 14. Interação entre XRCC1, hOGG1 e perfil de acetilação para NAT2 e o risco de CVAS.

| Genes | Casos n (%) | Controles n (%) | OR^a (IC 95%) | pValor | OR^b (IC 95%) | pValor |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| <i>XRCC1 / hOGG1</i> | | | | | | |
| Selvagem / Selvagem | 53 (45,3) | 81 (38,9) | Ref. | – | | |
| Mutante / Selvagem | 34 (29,1) | 55 (26,4) | 0,94 (0,54 - 1,64) | 0,84 | 0,77 (0,40 - 1,50) | 0,446 |
| Selvagem / Mutante | 16 (13,7) | 30 (14,4) | 0,81 (0,40 - 1,64) | 0,566 | 0,75 (0,33 - 1,72) | 0,506 |
| Mutante / Mutante | 14 (12,0) | 42 (20,2) | 0,51 (0,25 - 1,02) | 0,056 | 0,41 (0,18 - 0,93) | 0,033 |
| <i>XRCC1 / NAT2</i> | | | | | | |
| Selvagem / Rápido ou Intermediário | 30 (30,0) | 27 (23,3) | Ref. | – | | |
| Mutante / Rápido ou Intermediário | 21 (21,0) | 29 (25,0) | 0,65 (0,30 - 1,40) | 0,272 | 0,52 (0,21 - 1,27) | 0,153 |
| Selvagem / Lento | 29 (29,0) | 30 (25,9) | 0,87 (0,42 - 1,80) | 0,708 | 0,95 (0,40 - 2,27) | 0,912 |
| Mutante / Lento | 20 (20,0) | 30 (25,9) | 0,60 (0,28 - 1,29) | 0,191 | 0,48 (0,19 - 1,21) | 0,12 |
| <i>hOGG1 / NAT2</i> | | | | | | |
| Selvagem / Rápido ou Intermediário | 43 (43,0) | 39 (33,6) | Ref. | – | | |
| Mutante / Rápido ou Intermediário | 8 (8,0) | 17 (14,7) | 0,43 (0,16 - 1,10) | 0,073 | 0,61 (0,19 - 1,92) | 0,403 |
| Selvagem / Lento | 33 (33,0) | 38 (32,8) | 0,79 (0,42 - 1,49) | 0,462 | 1,02 (0,48 - 2,17) | 0,956 |
| Mutante / Lento | 16 (16,0) | 22 (19,0) | 0,66 (0,30 - 1,43) | 0,292 | 0,66 (0,27 - 1,60) | 0,359 |

^a OR não ajustada

^b OR ajustada para sexo, idade, tabagismo e cor da pele pelo modelo de regressão logística multivariada

6. DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se um risco de câncer 13,40 vezes maior para os indivíduos sempre fumantes e um risco 3,64 vezes maior para os sempre etilistas. Nota-se também um efeito de interação aditivo entre o tabagismo e o etilismo na elevação do risco de CVAS, ou seja, o valor de OR verificado para a exposição simultânea a esses dois fatores (15,84) foi semelhante à soma dos riscos associados ao tabagismo e ao etilismo individualmente.

Muitos dos compostos presentes no cigarro são carcinogênicos e explicam o fato do cigarro aumentar o risco de CVAS. Dessa forma, o risco de desenvolvimento dessa neoplasia é proporcional ao número de cigarros, tempo de fumo e interação com o álcool (Franceschi *et al.*, 1990; Talamini *et al.*, 1990). O número de cigarros e tempo de fumo estão intrinsecamente associados a quantidade de metabólitos reativos introduzidos no organismo. Fato este, que explica o maior risco de fumantes pesados (>20 cigarros-ano) em comparação aos fumantes moderados (≤ 20 maços-ano). No presente estudo, o risco para CVAS de fumantes moderados foi 9,16 enquanto que para os fumantes leves foi de 17,0.

O efeito do álcool na etiologia do câncer não é muito claro, ele pode atuar como um solvente de outros carcinógenos ou pode gerar espécies reativas de oxigênio, causando danos diretamente no DNA (Wight e Ogden, 1998; Boffetta *et al.*, 2006). A primeira hipótese explica o efeito sinérgico com o fumo. No entanto, a segunda hipótese explica o consumo de álcool como um fator independente de risco para o desenvolvimento de CVAS verificado em nosso estudo.

Apesar do fumo e álcool estarem diretamente associados com o risco de CVAS, não são causas exclusivas, fato este que pode ser observado pela presença de indivíduos não etilistas e não tabagistas que desenvolvem esse tipo de neoplasia como também a existência de indivíduos tabagistas e/ou etilistas que não desenvolveram esse tipo de câncer. Desse modo, pode-se atribuir parte do risco a diferenças genéticas interindividuais existentes dentro e entre as populações humanas.

Diversas classes de genes têm sido estudadas como possíveis alvos no risco de desenvolvimento de câncer. Dentre elas encontram-se os genes que codificam enzimas de metabolização de xenobióticos e enzimas de reparo de DNA (Bendjemana *et al.*, 2006; Boccia *et al.*, 2008), por isso, o presente trabalho objetivou analisar a enzima NAT2, XRCC1 e hOGG1 .

A enzima NAT2 é uma enzima de fase II capaz de realizar N-acetilação em vias de detoxificação; O-acetilação e N,O-acetilação em vias de metabolização (Vatsis *et al.*, 1995). Além da metabolização de algumas aminas aromáticas e drogas hidrazinas (Weber e Hein, 1985), a NAT2 pode modificar a predisposição a cânceres com o papel na bioativação e detoxificação de carcinógenos aromáticos e aminas heterocíclicas (Hein *et al.*, 2000). A NAT2 é uma enzima que pode ter sua atividade catalítica influenciada por diversos SNPs em seu gene. Dessa forma, a inferência da atividade enzimática que corresponde ao seu fenótipo (lento ou rápido) pode ser determinada pela combinação haplotípica dos SNPs encontrados no gene *NAT2*.

Diversos SNPs tem sido estudados como modificadores de risco para neoplasias (Balaji *et al.*, 2011; De Lima Junior *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2001; Gara *et al.*, 2007), no entanto, os resultados para a determinação do risco para SNPs analisados individualmente são inconsistentes. O gene *NAT2* possui 31 SNPs descritos (Hein, 2009), contudo, a grande maioria são variantes raras, além de que muitos desses SNPs possuem variações nas frequências a depender da população estudada (Grant *et al.*, 1997).

No presente trabalho foram analisados 14 SNPs (Tabela 7), sendo que sete destes (C190T, G363A, A411T, A434C, G499A, C759T e A845C) foram monomórficos para o alelo selvagem e por isso não entraram nas análises de associação com CVAS. Os SNPs restantes (G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G e G857A) foram testados para associação com o CVAS. Dos SNPs analisados, apenas o A803G foi associado como um fator de proteção para o CVAS na população estudada (OR: 0,44; IC 95%: 0,24 – 0,82; p = 0,01). Outro estudo realizado no Brasil (De Lima Junior *et al.*, 2012) encontrou uma associação de proteção para esse SNPs em pacientes com câncer de próstata, apesar disso, é difícil a determinação da função desse SNPs na etiologia da doença pois este isoladamente não é capaz de alterar a estabilidade, atividade catalítica ou expressão proteica (Hein, 2009).

Os haplótipos foram determinados através das diferentes combinações dos sete SNPs polimórficos. Foram encontrados 21 haplótipos diferentes (Tabela 8), sendo que 12 conferem um fenótipo de N-acetilação lento, 6 conferem um perfil de N-acetilação rápido e dois haplótipos não possuem efeitos conhecidos. No presente estudo, os haplótipos mais frequentes tanto nos casos como controles foram NAT2*4, NAT2*6A, NAT2*5B, os quais corresponderam a 75,3% dos genótipos para os controles e 65,5% dos casos. Esses dados corroboram com o estudo realizado por (Talbot *et al.*, 2011) na

mesma população e foi verificada como haplótipo de maior frequência o NAT2*4. Esses dados também são consistentes com outro estudo realizado na América Latina (Fuselli *et al.*, 2007), que encontrou como haplótipos de maior frequência o NAT2*4 e NAT2*5B correspondendo a 60%.

Todos os haplótipos foram testados para associação com CVAS, entretanto, apenas o haplótipo NAT2*5C foi associado ao risco de câncer (OR: 4,31; IC 95%: 1,13 – 16,48; $p = 0,023$). Este haplótipo é responsável por codificar uma enzima de metabolização lenta (Hein, 2009).

Diversos estudos de associação com câncer de cabeça e pescoço em diferentes países relataram associação de risco com haplótipos que conferem um perfil de metabolização lenta (Hou *et al.*, ; Ying *et al.*, ; Gajecka *et al.*, 2005; Bendjemana *et al.*, 2006), o que sugere uma ineficiência na eliminação de compostos carcinogênicos pela NAT2. No entanto, alguns estudos não são consistentes com esses resultados, pois encontraram como fator de risco, genótipos associados ao perfil de acetilação rápido ou intermediário (Marques *et al.*, 2006; Buch *et al.*, 2008). Essa divergência de resultados sugere que fatores étnico-geográficos, além das diferenças de hábitos de vida existentes entre essas populações, possam modificar o impacto desse polimorfismo sobre o risco de doença.

Outro fator que pode estar fortemente influenciando esses resultados é a quantidade de SNPs analisados nos diferentes estudos. A seleção dos SNPs para determinação dos haplótipos não é padronizada, ficando a critério dos pesquisadores, o que torna difícil as análises de comparações entre estudos diferentes. O número de SNPs utilizados para a determinação dos haplótipos difere muito, podendo variar de um (Marques *et al.*, 2006), dois (Gara *et al.*, 2007), três (Balaji *et al.*, ; Demokan *et al.*, 2010), quatro (Hou *et al.*), cinco (Chen *et al.*, 2001), seis (Gajecka *et al.*, 2005; Mckay *et al.*, 2008) e 13 (Buch *et al.*, 2008). A escolha da quantidade e tipo de SNPs está principalmente relacionado a técnica utilizada para as genotipagens. Em geral, estudos que utilizam a técnica de RFLP procuram utilizar poucos SNPs devido a limitações da técnica. Por outro lado, estudos que utilizam sequenciamento podem analisar um maior número de SNPs. Um importante efeito dessa heterogeneidade na seleção dos SNPs foi evidenciado no estudo realizado por Buch *et al.*, 2008, que encontrou um risco para CVAS para acetiladores rápidos analisando 13 SNPs, no entanto, quando foi analisado apenas os 4 SNPs mais frequentemente estudados, a associação não se manteve. Apesar de não ter sido relatado quais SNPs foram utilizados na nova análise, os resultados

foram muito discrepantes, uma vez que 58,8% dos acetiladores lentos de acordo com 13 SNPs foram reclassificados como acetiladores rápidos com base nos 4 SNPs. Esses dados sugerem que a utilização de um maior número de SNPs polimórficos para a inferência dos perfis de acetilação de NAT2 pode ser mais adequado, sobretudo em populações nas quais esses polimorfismos não apresentam um padrão de desequilíbrio de ligação forte entre si. Nesse último caso, o emprego de um número reduzido de SNPs objetivando capturar a maior parte da variabilidade genética presente no gene *NAT2* (*tag* SNPs) poderia não ser a melhor estratégia, sendo necessário utilizar um maior número de marcadores para inferências mais acuradas tanto dos haplótipos quanto dos perfis de acetilação.

Na análise de associação do perfil de acetilação com risco de CVAS, o fenótipo acetilador rápido foi considerado como grupo referência (alelo selvagem NAT2*4/*4). Não foram observadas diferenças significantes para a distribuição desses fenótipos entre casos e controles. Indivíduos classificados como acetiladores intermediários não apresentaram um risco estatisticamente diferente de desenvolvimento de CVAS em comparação aos acetiladores rápidos (OR: 1,06; IC 95%: 0,47 – 2,38; p = 0,878). Do mesmo modo, não houve diferença na comparação entre N-acetiladores lentos e rápidos (OR: 0,95; IC 95% 0,44 – 2,06; p = 0,907). Esses dados sugerem que o fenótipo do NAT2 baseado no perfil de metabolização não está associado ao risco de CVAS, o que corrobora com os dados de duas recentes metanálises (Ying *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2012), além de diversos estudos que demonstraram que o status de acetilador não tem impacto no risco de câncer (Balaji *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2003; Boccia *et al.*, 2008; Mckay *et al.*, 2008; Demokan *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012).

Para as análises de interação entre os fenótipos N-acetiladores e o tabagismo na modulação do risco de CVAS, como forma de aumentar o poder estatístico das análises, os fenótipos rápido e intermediário foram agrupados em uma mesma categoria, assumida como o grupo referência. O fenótipo acetilador lento não foi significativamente associado ao risco de CVAS para nenhuma das categorias de fumantes consideradas (nunca fumantes, fumantes moderados e pesados). Esses resultados permaneceram não significantes após ajustes para outras variáveis de risco pela aplicação de um modelo de regressão logística multivariada. Esses dados sugerem que não há um efeito de interação significativa entre os fenótipos de NAT2 e o tabagismo na modificação do risco de CVAS.

Quanto à interação entre os fenótipos N-acetiladores e o etilismo na modulação do risco de CVAS, a exemplo do verificado para o tabagismo, o fenótipo acetilador lento não foi significativamente associado ao risco de CVAS para nenhuma das categorias de etilistas consideradas, o que se manteve após ajustes para outras variáveis de risco pela aplicação de um modelo de regressão logística multivariada. Também nesse caso não foi verificado um efeito de interação significante entre os fenótipos de NAT2 e o etilismo na modulação do risco de CVAS. Esses resultados divergem de outros dois estudos (Hou *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2001) verificaram uma associação do fenótipo lento com um risco aumentado para CVAS em pacientes caracterizados como sempre etilistas.

Considerando as associações entre os fenótipos de NAT2 e os diferentes parâmetros clinicopatológicos avaliados, não foi observada associação significativa dos fenótipos N-acetiladores com o estágio clínico, grau histológico do tumor, positividade de linfonodos regionais ou tamanho tumoral. Esses resultados indicam que não há influência do perfil de acetilação para desenvolvimento e gravidade da doença. De nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a avaliar a associação do perfil de acetilação com os parâmetros clínico-patológicos no CVAS, o que impede a comparação de dados obtidos por outros autores.

Ao contrário da nossa hipótese, o perfil de acetilação da enzima NAT2 não alterou o risco de CVAS no presente estudo. Apesar do consumo de cigarro e álcool estar intrinsecamente associado ao risco de desenvolvimento dessa neoplasia, não encontramos evidências de que esse risco esteja associado ao status de acetilação de NAT2. De fato, após a bioativação por enzimas de fase I, os compostos carcinogênicos, como os presentes na fumaça do cigarro e poluentes ambientais, são detoxificados por enzimas de fase II como a NAT2 para posterior excreção (Lazarus e Park, 2000). Caso não sejam eliminados eficientemente podem causar danos no DNA da célula que se não forem devidamente reparados, podem levar a alterações na função de genes e originar um processo neoplásico (Hopkins *et al.*, 2008). No entanto, os dados do presente estudo sugerem que apesar do cigarro conter diversos compostos metabolizados pela NAT2, esta enzima não desempenha papel na etiologia do CVAS.

Com relação aos genes que codificam para enzimas de reparo, o polimorfismo Arg399Gln de *XRCC1* tem sido relacionado a uma menor capacidade de atividade reparadora de danos ao DNA. Um estudo que avaliou esse SNP em linfócitos periféricos de doadores saudáveis relatou que no grupo de indivíduos homocigotos

mutantes/heterozigotos houve um aumento significativo na quantidade de trocas de cromátides irmãs em resposta a 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), uma nitrosamina específica do cigarro (Abdel-Rahman e El-Zein, 2000). Além disso, o genótipo polimórfico de XRCC1 Arg399Gln foi associado a um maior número de quebras cromossômicas induzidas pela droga bleomicina em linfócitos isolados de indivíduos saudáveis (Wang *et al.*, 2003). Com base nesses achados é razoável supor que indivíduos portadores do polimorfismo Arg399Gln seriam mais susceptíveis ao efeito genotóxico de carcinógenos ambientais, podendo apresentar um risco diferenciado de desenvolvimento de câncer. De fato, diferentes estudos epidemiológicos têm reportado esse polimorfismo como um fator de risco significativamente associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, a exemplo do câncer de mama (Metsola *et al.*, 2005), câncer colorretal (Abdel-Rahman e El-Zein, 2000) e câncer de pulmão (Divine *et al.*, 2001). No entanto, esses achados não têm sido confirmados por outros autores (Harms *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Lopez-Cima *et al.*, 2007). No presente estudo não foi observada uma associação significativa do polimorfismo XRCC1 Arg399Gln com o risco de CVAS, corroborando com o relatado por outros autores (Demokan *et al.*, 2005; Anantharaman *et al.*, 2011).

O polimorfismo hOGG1 Ser326Cys, por sua vez, tem sido associado como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de esôfago (Xing *et al.*, 2001), pulmão (Park *et al.*, 2004), próstata (Xu J. *et al.*, 2002) e nasofaringe (Cho *et al.*, 2003). Novamente, esses resultados não têm sido replicados em outros estudos (Vogel *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2005). Além disso, estudos bioquímicos avaliando o impacto funcional desse polimorfismo sobre a atividade da enzima hOGG1 têm gerado resultados controversos. Dherin *et al.*, (1999) relataram que as formas variante e selvagem de hOGG1 apresentaram atividades enzimáticas similares, enquanto que Hill, *et al.* (2006) relatou que a isoforma variante Cys326 é deficiente em sua atividade catalítica. Além disso, Janssen *et al.*, (2001) descreveram que a atividade de excisão de hOGG1 em extratos proteicos preparados de linfócitos humanos não foi afetada pelo polimorfismo Ser326Cys. Por fim, Luna *et al.* (2005) reportaram que diferentemente da forma selvagem Ser326, a variante Cys326 não é translocada para o nucléolo durante a fase S do ciclo celular, muito provavelmente em função de uma mudança em seu estado de fosforilação. Em nosso estudo esse polimorfismo, a exemplo do XRCC1 Arg399Gln, não foi significativamente associado como um fator de risco ou de proteção para o CVAS em nenhum dos modelos genéticos de doença considerados.

Dado o caráter multifatorial do câncer, a herança de múltiplos genes envolvidos em vias-chave de detoxificação de carcinógenos e reparo de danos ao DNA, além da interação desses com fatores ambientais, deve ser mais informativa para a identificação de indivíduos geneticamente mais susceptíveis do que a análise de cada gene independentemente. Por esse motivo, foram conduzidas análises de interação gene-gene e gene-ambiente entre os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln, hOGG1 Ser326Cys, perfis de acetilação de NAT2, tabagismo e etilismo na modificação do risco de CVAS.

Nas análises de interação gene-gene, foi verificado que indivíduos que portaram simultaneamente ao menos um alelo mutante de XRCC1 Arg399Gln e hOGG1 Ser326Cys apresentaram um risco significativamente menor de desenvolvimento de CVAS em comparação àqueles que foram homozigotos selvagens para ambos os polimorfismos. Além disso, o polimorfismo hOGG1 Ser326Cys foi um fator de proteção para o CVAS entre os fumantes leves, enquanto que o polimorfismo XRCC1 Arg399Gln foi significativamente associado com a redução do risco de CVAS entre os nunca etilistas. Esses últimos resultados sugerem que, de forma análoga aos polimorfismos em genes biometabolizadores, as variantes dos genes de reparo poderiam influenciar a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer apenas sob mais baixos níveis de exposição a carcinógenos (Vineis e Martone, 1998). Uma possível explicação para o efeito protetor conferido pelos alelos mutantes desses genes de reparo é que o aumento nos níveis de danos no DNA, principalmente entre indivíduos fumantes, poderia aumentar os níveis de apoptose durante a divisão celular (Hung, 2005). Sendo assim, a via de apoptose favoreceria um efeito protetor para o desenvolvimento de câncer entre os portadores de alelos mutantes, uma vez que mutações que poderiam originar o carcinoma teriam uma menor probabilidade de serem acumuladas na célula.

Nenhuma interação significativa entre XRCC1 Arg399Gln e NAT2 ou hOGG1 Ser326Cys e NAT2 foram observadas. Ademais, não foi verificado nenhum efeito de interação significativa entre os fenótipos acetiladores de NAT2 e o consumo de tabaco ou álcool. A detecção de uma interação significativa apenas entre os polimorfismos dos genes de reparo aqui estudados poderia ser explicada pelo fato de que essas duas enzimas atuam sinergicamente numa mesma via de reparo de DNA (reparo por excisão de bases). De fato, a enzima XRCC1 participa da remoção de 8-oxiguaninas, nucleotídeo quimicamente modificado que é substrato da hOGG1 (Marsin *et al.*, 2003). A NAT2, por sua vez, participa juntamente com outras enzimas biometabolizadoras da detoxificação de xenobióticos, atuando como uma primeira barreira de proteção celular

contra ação de agentes carcinógenos. Dada a sua atividade em uma via bioquimicamente mais distante daquela compartilhada por *XRCC1* e *hOGG1*, a detecção de uma interação significativa entre esses genes poderia exigir um maior tamanho amostral que o utilizado no presente estudo.

7. CONCLUSÕES

- No presente estudo não foram verificadas associações significantes entre os perfis de acetilação da enzima NAT2 e o risco de desenvolvimento de CVAS. Os polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *hOGG1* Ser326Cys também não foram associados com o risco de CVAS em nenhum dos modelos genéticos de doenças considerados.
- Os parâmetros clínico patológicos avaliados não demonstraram associação estatisticamente significativa nem com os perfis de acetilação de NAT2 ou com os polimorfismos de *XRCC1* e *hGOO1*.
- O haplótipo NAT2*5C, o qual confere perfil de acetilação lento, foi significativamente associado como um fator de risco para o desenvolvimento de CVAS corroborando com dados relatados por outros autores.
- O polimorfismo *hOGG1* Ser326Cys foi associado como um fator de proteção para o CVAS entre fumantes moderados. O polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln, por sua vez, foi um fator de proteção para essas neoplasias entre nunca etilistas. Essas interações gene-ambiente verificadas sugerem que tais polimorfismos teriam maior efeito sobre o risco de CVAS sob mais baixo níveis de exposição a carcinógenos ambientais.
- A combinação dos genótipos variantes de *XRCC1* Arg399Gln e *hOGG1* Ser326Cys resultou em um menor risco de desenvolvimento de CVAS comparativamente aos genótipos duplos selvagens para esses genes. Esse efeito protetor dos alelos mutantes seria explicado por uma maior atividade apoptótica resultante do maior nível de danos ao DNA entre os indivíduos portadores desses polimorfismos, impedindo o acúmulo de mutações capazes de iniciar um processo carcinogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, S. Z. e R. A. El-Zein. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett*, v.159, n.1, Oct 16, p.63-71. 2000.
- Anantharaman, D., T. A. Samant, S. Sen e M. B. Mahimkar. Polymorphisms in tobacco metabolism and DNA repair genes modulate oral precancer and cancer risk. *Oral Oncol*, v.47, n.9, Sep, p.886-72. 2011.
- Arizono, K., Osada, Y., Kuroda, Y. DNA Repair Gene hOGG1 Codon 326 and XRCC1 Codon 399 Polymorphisms and Bladder Cancer Risk in a Japanese Population. *Jpn J Clin Oncol*, v.38(3), p.186–191. 2008.
- Badawi, A. F., A. Hirvonen, D. A. Bell, N. P. Lang e F. F. Kadlubar. Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res*, v.55, n.22, Nov 15, p.5230-7. 1995.
- Balaji, L., B. S. Krishna e V. K. S. B. L. An unlikely role for the NAT2 genotypes and haplotypes in the oral cancer of south Indians. *Arch Oral Biol*, Dec 1, 2011.
- Bendjemana, K., M. Abdennebi, S. Gara, A. Jmal, A. Ghanem, S. Touati, H. Boussen, A. Ladgham e F. Guemira. [Genetic polymorphism of glutathion-S transferases and N-acetyl transferases 2 and nasopharyngeal carcinoma: the Tunisia experience]. *Bull Cancer*, v.93, n.3, Mar 1, p.297-302. 2006.
- Boccia, S., G. Cadoni, F. A. Sayed-Tabatabaei, M. Volante, D. Arzani, A. De Lauretis, C. Cattel, G. Almadori, C. M. Van Duijn, G. Paludetti e G. Ricciardi. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, v.134, n.1, Jan, p.93-100. 2008.
- Boffetta, P., M. Hashibe, C. La Vecchia, W. Zatonski e J. Rehm. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer*, v.119, n.4, Aug 15, p.884-7. 2006.
- Boiteux, S. e J. P. Radicella. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, v.377, n.1, May 1, p.1-8. 2000.
- Boyer, K. L. Oncologia na clínica geral. p.292. 2000.
- Brockton, N., J. Little, L. Sharp e S. C. Cotton. N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, v.151, n.9, May 1, p.846-61. 2000.
- Buch, S. C., V. Nazar-Stewart, J. L. Weissfeld e M. Romkes. Case-control study of oral and oropharyngeal cancer in whites and genetic variation in eight metabolic enzymes. *Head Neck*, v.30, n.9, Sep, p.1139-47. 2008.

Chen, C., S. Ricks, D. R. Doody, E. D. Fitzgibbons, P. L. Porter e S. M. Schwartz. N-Acetyltransferase 2 polymorphisms, cigarette smoking and alcohol consumption, and oral squamous cell cancer risk. *Carcinogenesis*, v.22, n.12, Dec, p.1993-9. 2001.

Cheng, Y. J., Y. C. Chien, A. Hildesheim, M. M. Hsu, I. H. Chen, J. Chuang, J. Chang, Y. D. Ma, C. T. Luo, W. L. Hsu, H. H. Hsu, H. Huang, J. F. Chang, C. J. Chen e C. S. Yang. No association between genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2, and nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.12, n.2, Feb, p.179-80. 2003.

Cho, E. Y., A. Hildesheim, C. J. Chen, M. M. Hsu, I. H. Chen, B. F. Mittl, P. H. Levine, M. Y. Liu, J. Y. Chen, L. A. Brinton, Y. J. Cheng e C. S. Yang. Nasopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.12, n.10, Oct, p.1100-4. 2003.

Choong, N. e E. Vokes. Expanding role of the medical oncologist in the management of head and neck cancer. *CA Cancer J Clin*, v.58, n.1, Jan-Feb, p.32-53. 2008.

Cunningham, F. H., S. Fiebelkorn, M. Johnson e C. Meredith. A novel application of the Margin of Exposure approach: segregation of tobacco smoke toxicants. *Food Chem Toxicol*, v.49, n.11, Nov, p.2921-33.

De Lima Junior, M. M., L. O. Reis, A. C. Guilhen, F. Granja, M. N. De Lima Oliveira, U. Ferreira, L. L. Cunha e L. S. Ward. N-acetyltransferase-2 gene polymorphisms and prostate cancer susceptibility in Latin American patients. *Med Oncol*, Jan 14, 2012.

Deguchi, T. Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine N-acetyltransferase of human liver. *J Biol Chem*, v.267, n.25, Sep 5, p.18140-7. 1992.

Demokan, S., D. Demir, Y. Suoglu, E. Kiyak, U. Akar e N. Dalay. Polymorphisms of the XRCC1 DNA repair gene in head and neck cancer. *Pathol Oncol Res*, v.11, n.1, p.22-5. 2005.

Demokan, S., Y. Suoglu, M. Gozeler, D. Demir e N. Dalay. N-acetyltransferase 1 and 2 gene sequence variants and risk of head and neck cancer. *Mol Biol Rep*, v.37, n.7, Oct, p.3217-26. 2010.

Dherin, C., J. P. Radicella, M. Dizdaroglu e S. Boiteux. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res*, v.27, n.20, Oct 15, p.4001-7. 1999.

Divine, K. K., F. D. Gilliland, R. E. Crowell, C. A. Stidley, T. J. Bocklage, D. L. Cook e S. A. Belinsky. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res*, v.461, n.4, Jan 5, p.273-8. 2001.

- Franceschi, S., R. Talamini, S. Barra, A. E. Baron, E. Negri, E. Bidoli, D. Serraino e C. La Vecchia. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res*, v.50, n.20, Oct 15, p.6502-7. 1990.
- Fuselli, S., R. H. Gilman, S. J. Chanock, S. L. Bonatto, G. De Stefano, C. A. Evans, D. Labuda, D. Luiselli, F. M. Salzano, G. Soto, G. Vallejo, A. Sajantila, D. Pettener e E. Tarazona-Santos. Analysis of nucleotide diversity of NAT2 coding region reveals homogeneity across Native American populations and high intra-population diversity. *Pharmacogenomics J*, v.7, n.2, Apr, p.144-52. 2007.
- Gajecka, M., M. Rydzanicz, R. Jaskula-Sztul, M. Kujawski, W. Szyfter e K. Szyfter. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. *Mutat Res*, v.574, n.1-2, Jul 1, p.112-23. 2005.
- Gara, S., M. Abdennebi, S. Chatti, S. Touati, A. Ladgham e F. Guemira. Association of NAT2 gene substitution mutation T341C with increased risk for head and neck cancer in Tunisia. *Acta Oncol*, v.46, n.6, p.834-7. 2007.
- Ginsberg, G., K. Angle, K. Guyton e B. Sonawane. Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutat Res*, v.727, n.1-2, Jan-Apr, p.1-15. 2011.
- Grant, D. M., N. C. Hughes, S. A. Janezic, G. H. Goodfellow, H. J. Chen, A. Gaedigk, V. L. Yu e R. Grewal. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat Res*, v.376, n.1-2, May 12, p.61-70. 1997.
- Harms, C., S. A. Salama, C. H. Sierra-Torres, N. Cajas-Salazar e W. W. Au. Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer. *Environ Mol Mutagen*, v.44, n.1, p.74-82. 2004.
- Hecht, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*, v.3, n.10, Oct, p.733-44. 2003.
- Hein, D. W. N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene*, v.25, n.11, Mar 13, p.1649-58. 2006.
- Hein, D. W. N-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, v.5, n.4, Apr, p.353-66. 2009.
- Hein, D. W., M. A. Doll, A. J. Fretland, M. A. Leff, S. J. Webb, G. H. Xiao, U. S. Devanaboyina, N. A. Nangju e Y. Feng. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.9, n.1, Jan, p.29-42. 2000.

Hiyama, T., M. Yoshihara, S. Tanaka e K. Chayama. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol*, v.32, n.5, May, p.945-73. 2008.

Hopkins, J., D. W. Cescon, D. Tse, P. Bradbury, W. Xu, C. Ma, P. Wheatley-Price, J. Waldron, D. Goldstein, F. Meyer, I. Bairati e G. Liu. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.17, n.3, Mar, p.490-9. 2008.

Hou, Y. Y., H. L. Ou, S. T. Chu, P. C. Wu, P. J. Lu, C. C. Chi, K. W. Leung, C. Y. Lee, P. H. Wu, M. Hsiao e L. P. Ger. NAT2 slow acetylation haplotypes are associated with the increased risk of betel quid-related oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.112, n.4, Oct, p.484-92, 2011.

Hung, R. J., J. Hall, P. Brennan e P. Boffetta. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, v.162, n.10, Nov 15, p.925-42. 2005.

INCA. Estimativa 2010. Incidência de câncer no Brasil. *Instituto Nacional do Câncer*, 98p. 2009.

Janssen, K., K. Schlink, W. Gotte, B. Hippler, B. Kaina e F. Oesch. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat Res*, v.486, n.3, Aug 9, p.207-16. 2001.

Kamangar, F., G. M. Dores e W. F. Anderson. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*, v.24, n.14, May 10, p.2137-50. 2006.

Kato, I. e A. M. Nomura. Alcohol in the aetiology of upper aerodigestive tract cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v.30B, n.2, p.75-81. 1994.

Kato, I., A. M. Nomura, G. N. Stemmermann e P. H. Chyou. Prospective study of the association of alcohol with cancer of the upper aerodigestive tract and other sites. *Cancer Causes Control*, v.3, n.2, Mar, p.145-51. 1992.

Lazarus, P. e J. Y. Park. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*, v.36, n.5, Sep, p.421-31. 2000.

Lopez-Cima, M. F., P. Gonzalez-Arriaga, L. Garcia-Castro, T. Pascual, M. G. Marron, X. S. Puente e A. Tardon. Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of northern Spain. *BMC Cancer*, v.7, p.162. 2007.

Marques, C. F., S. Koifman, R. J. Koifman, P. Boffetta, P. Brennan e A. Hatagima. 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*, v.42, n.6, Jul, p.632-7. 2006.

Marsin, S., A. E. Vidal, M. Sossou, J. Me´ Nissier-De Murcia, F. Le Page, S. Boiteux, G. De Murcia e J. P. Radicella. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J. Biol. Chem.*, p.44068-44074. 2003.

Mckay, J. D., M. Hashibe, R. J. Hung, J. Wakefield, V. Gaborieau, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Zaridze, J. Lissowska, P. Rudnai, E. Fabianova, D. Mates, L. Foretova, V. Janout, V. Bencko, A. Chabrier, J. Hall, P. Boffetta, F. Canzian e P. Brennan. Sequence variants of NAT1 and NAT2 and other xenometabolic genes and risk of lung and aerodigestive tract cancers in Central Europe. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.17, n.1, Jan, p.141-7. 2008.

Metsola, K., V. Kataja, P. Sillanpaa, P. Siivola, L. Heikinheimo, M. Eskelinen, V. M. Kosma, M. Uusitupa e A. Hirvonen. XRCC1 and XPD genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish case-control study. *Breast Cancer Res*, v.7, n.6, p.R987-97. 2005.

Park, J., L. Chen, M. S. Tockman, A. Elahi e P. Lazarus. The human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk. *Pharmacogenetics*, v.14, n.2, Feb, p.103-9. 2004.

Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay e P. Pisani. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, v.55, n.2, Mar-Apr, p.74-108. 2005.

Paz-Elizur, T., Z. Sevilya, Y. Leitner-Dagan, D. Elinger, L. C. Roisman e Z. Livneh. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett*, v.266, n.1, Jul 18, p.60-72. 2008.

Pollock, R. E. D., J.H.; Khayat, D.; Nakao, A.; O'sullivan, B. Pollock, R.E. Manual de oncologia clínica da UICC, v.8. 2006. 919 p.

Rodgman, A., C. J. Smith e T. A. Perfetti. The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Hum Exp Toxicol*, v.19, n.10, Oct, p.573-95. 2000.

Shibuya, K., C. D. Mathers, C. Boschi-Pinto, A. D. Lopez e C. J. Murray. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*, v.2, Dec 26, p.37. 2002.

Talamini, R., S. Franceschi, S. Barra e C. La Vecchia. The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers. *Int J Cancer*, v.46, n.3, Sep 15, p.391-3. 1990.

- Talbot, J., L. A. Magno, C. V. Santana, S. M. Sousa, P. R. Melo, R. X. Correa, G. Di Pietro e F. Rios-Santos. Interethnic diversity of NAT2 polymorphisms in Brazilian admixed populations. *BMC Genet*, v.11, p.87.
- Vatsis, K. P., W. W. Weber, D. A. Bell, J. M. Dupret, D. A. Evans, D. M. Grant, D. W. Hein, H. J. Lin, U. A. Meyer, M. V. Relling e Et Al. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, v.5, n.1, Feb, p.1-17. 1995.
- Vogel, U., B. A. Nexø, H. Wallin, K. Overvad, A. Tjønneland e O. Raaschou-Nielsen. No association between base excision repair gene polymorphisms and risk of lung cancer. *Biochem Genet*, v.42, n.11-12, Dec, p.453-60. 2004.
- Walraven, J. M., Y. Zang, J. O. Trent e D. W. Hein. Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Curr Drug Metab*, v.9, n.6, Jul, p.471-86. 2008.
- Wang, Y., M. R. Spitz, Y. Zhu, Q. Dong, S. Shete e X. Wu. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst)*, v.2, n.8, Aug 12, p.901-8. 2003.
- Weber, W. W. e D. W. Hein. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev*, v.37, n.1, Mar, p.25-79. 1985.
- Weiss, J. M., E. L. Goode, W. C. Ladiges e C. M. Ulrich. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog*, v.42, n.3, Mar, p.127-41. 2005.
- Wight, A. J. e G. R. Ogden. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol*, v.34, n.6, Nov, p.441-7. 1998.
- Xing, D. Y., W. Tan, N. Song e D. X. Lin. Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, v.95, n.3, May 20, p.140-3. 2001.
- Xu J., Zheng S. L., Turner A., Isaacs S. D., Wiley K. E., Hawkins G. A., Chang B. L., Bleecker E. R., Walsh P. C., Meyers D. A. e I. W. B. Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res.*, Apr p.2253-7. 2002.
- Ying, X. J., P. Dong, B. Shen, J. Wang, S. Wang e G. Wang. Possible association of NAT2 polymorphism with laryngeal cancer risk: an evidence-based meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, v.137, n.11, Nov, p.1661-7.
- Zang, Y., M. A. Doll, S. Zhao, J. C. States e D. W. Hein. Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis*, v.28, n.8, Aug, p.1665-71. 2007.

Zang, Y., S. Zhao, M. A. Doll, J. C. States e D. W. Hein. The T341C (Ile114Thr) polymorphism of N-acetyltransferase 2 yields slow acetylator phenotype by enhanced protein degradation. *Pharmacogenetics*, v.14, n.11, Nov, p.717-23. 2004.

Zhang, Y., P. A. Newcomb, K. M. Egan, L. Titus-Ernstoff, S. Chanock, R. Welch, L. A. Brinton, J. Lissowska, A. Bardin-Mikolajczak, B. Peplonska, N. Szeszenia-Dabrowska, W. Zatonski e M. Garcia-Closas. Genetic polymorphisms in base-excision repair pathway genes and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.15, n.2, Feb, p.353-8. 2006.

Zheng, Y. Y., Y. Li, Y. S. Teng, Z. Zhang e X. L. Ca. Association of NAT2 phenotype with risk of head and neck carcinoma: A meta-analysis. *Oncology Letters*, v.3, n.2, Feb, p.429-434. 2012.

ANEXO 2



PROJETO: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES NAT2 E GST COM O
CARCINOMA DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

Questionário N° __/__/__/__

Entrevistador: _____

Data: __/__/__

Banco de Sangue: _____

N° no banco de sangue:

__/__/__/__

Dados do Entrevistado

Nome completo: _____

Idade: _____ anos

Data de nascimento: __/__/__

Sexo: Masculino Feminino

Naturalidade: _____

Raça: Branca Negra ou Parda Índia ou mestiça de índio Asiático
 Outras: _____

Estado civil: Solteiro Casado União consensual Outros

Filiação:

Nome de mãe: _____

Naturalidade: _____

Raça: Branca Negra ou Pardo Índia ou mestiça de índio Asiático

Genitores: Avó: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Avô: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Nome do pai: _____

Naturalidade: _____

Raça: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Genitores: Avó Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Avô: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Grau de Escolaridade do voluntário:

Analfabeto 1° grau completo 2° grau incompleto

Assina apenas o nome 1° grau incompleto Superior completo

Alfabetizado 2° grau completo Superior

incompleto

Ocupação:

Atual: _____

Ocupações Anteriores: Trabalhador Rural _____

(Tempo: _____)

Manipulação de Agrotóxico: Sim Não
 (Frequência: _____)
 Indústria ou empresa: _____
 (Tempo: _____)
 Exposição a agentes químicos: Sim Não
 (Frequência _____)
 Outros: _____
 (Tempo: _____)
 Exposição a carcinógenos Sim Não (Frequência
 _____)

Residência: Zona rural Zona urbana

Endereço e Tel:

Dados Socioeconômicos e Culturais:

Hábitos de vida:

Etilismo: Sim Não Ex-etilistas: Sim Não

Não

O que bebe _____

O que bebia

Quantidade (Doses/dia) _____

Quantidade (Doses/dia)

Há quanto tempo _____

Por quanto tempo

Tabagismo: Sim Não

Ex-tabagistas: Sim

Não

Se sim: Quantidade /Dia _____

Quantidade/Dia

Há quanto tempo _____

Por quanto tempo

Hábitos Alimentares:

1- Diariamente

3- Semanalmente

5- Raramente

2- 3 vezes por semana

4- Mensalmente

6- Não se aplica

Churrasco

Frituras

Carne Cozida

Embutidos e Defumados

Legumes e vegetais (*tipos mais consumidos*):

Frutas (*tipos mais consumidos*): _____

Câncer aerodigestivo (tipo): _____ Tempo do diagnóstico: _____
Estadiamento: _____ Histopatologia: _____

Histórico patológico do indivíduo:

- *Tuberculose* Sim Não Não sabe informar
 Uso de antibiótico
- *Hanseníase* Sim Não Não sabe informar
 Uso de antibiótico
- *Câncer* Sim Não Não sabe informar

Histórico de doenças na família:

- *Tuberculose* Sim Não Não sabe informar
 Parentesco: _____ Há quanto tempo: _____
- *Hanseníase* Sim Não Não sabe informar
 Parentesco: _____ Há quanto tempo: _____
- *Câncer* Sim Não Não sabe informar
 Parentesco: _____ Há quanto tempo: _____