

*À memória do meu pai.
Aos meus filhos para
que nunca se esqueçam:
"desistir não é uma opção".*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e do qual resultou a elaboração desta dissertação. Uma palavra mais gostaria de deixar para aqueles que ao longo dos anos, e foram muitos, detiveram um papel relevante no meu percurso. A esses, o meu profundo agradecimento.

Ao Professor Doutor Fernando de Jesus Regateiro, professor catedrático da Faculdade de Medicina, da UC, diretor da Unidade de Genética Médica e meu orientador, por me ter recebido e me ter aberto as portas a um mundo diferente, permitindo a minha valorização.

À Professora Doutora Lina Carvalho, professora associada com agregação, da Unidade de Anatomia, da Faculdade de Medicina, da UC, pela colaboração prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Robalo Cordeiro pela confiança que depositou em mim ao integrar-me na equipa do Centro de Investigação do Serviço de Pneumologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Ao Dr Mário Loureiro, diretor da Unidade de Pneumologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pela sua grande amabilidade e colaboração. À Dra Alice Pego, assistente hospitalar graduada da Unidade de Pneumologia, dos HUC, pela sua dedicação, conselhos e ensinamentos. À enfermeira Luísa Canhão, enfermeira no Hospital S. Jerónimo, pelo carinho e toda disponibilidade demonstrada. Um sincero muito obrigado aos três.

À Professora Doutora Catarina Oliveira, professora catedrática da Faculdade de Medicina, da UC, pela sua disponibilidade, compreensão e dedicação. Muito obrigada pelos seus conselhos, ficar-me-ão na memória.

Ao Professor Doutor Rogério Pereira Leal, professor catedrático de Engenharia Mecânica e Provedor do estudante, da UC, pela amabilidade e compreensão com que sempre me recebeu, pelos seus sábios conselhos, quão úteis foram para a concretização desta minha tarefa. Muito obrigada por me ter ouvido em momentos tão difíceis deste percurso.

Ao Professor Doutor Jorge Colaço, Professor catedrático da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pelo carinho com que me recebeu e prontamente me auxiliou, pelos seus ensinamentos, tão úteis foram na análise do meu trabalho.

À Dra Maria João Soares, da Unidade de Psicologia, da Faculdade de Medicina, da UC, pelas horas infindáveis de ensinamentos e pela amizade que daí se gerou.

Aos meus verdadeiros amigos, Ana Patrícia, Kiril por estarem sempre presentes. À minha tia, por estar na minha vida, sem ela nada teria chegado a bom porto.

À minha mãe pelo apoio que me deu.

Por fim, aos meus dois rapazes, Gonçalo e André, forças de impulsão da minha vida.

Resumo

A complexa interação entre o ambiente e os fatores genéticos desafia a compreensão da etiologia do cancro do pulmão.

Tal como noutras neoplasias epiteliais, o cancro do pulmão resulta de uma série de lesões pré-neoplásicas progressivas, consequência da interação entre as exposições ocupacionais ou ambientais e uma susceptibilidade individual que pode conferir uma fragilidade intrínseca ao indivíduo.

O consumo do tabaco já há muito foi considerado como um factor de risco para o cancro do pulmão, embora apenas 20% dos fumadores desenvolvam esta doença. O fumo do tabaco contém diversos carcinogénios incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), N-nitrosaminas e aminas heterocíclicas que, após biotransformação, podem formar aductos de ADN e participarem na iniciação da carcinogénese.

Entre os genes envolvidos na biotransformação de xenobióticos, foram estudados os genes *CYP1A1* e *CYP2D6* pertencentes à família do citocromo P450. As enzimas codificadas por estes genes atuam na biotransformação oxidativa de substratos, na fase I do metabolismo de xenobióticos. Da fase II do metabolismo foram estudados os genes que codificam a glutationa S-transferase (*GSTs*) envolvida na conjugação e a N-acetiltransferase (*NAT2*) envolvida na acetilação.

As múltiplas alterações genéticas encontradas em tecidos de cancro do pulmão envolvem genes supressores tumorais, de que se salientam as mutações do gene *TP53*. O aumento de proteína mutada, avaliado por imunohistoquímica, foi usado como biomarcador para identificar a presença de mutações em *TP53* e estabelecer associações com factores de risco.

O estudo teve a aprovação das Comissões de ética do Hospital e da Faculdade de Medicina, da Universidade de Coimbra.

Utilizando as técnicas de PCR-RFLP, “real time” PCR e PCR multiplex, foram avaliadas três variantes alélicas de CYP450 (*CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP2D6*4*), bem como de *NAT2* e *GSTP1(Ile105Val)*, *GSTT1* e *GSTM1* (alelos nulos), em duas populações da Região Centro de Portugal, uma constituída por doentes com cancro do pulmão (n=200) e outra utilizada como população controlo (n=247).

A análise combinada de todos os alelos estudados por regressão logística, evidenciou associações estatisticamente significativas para *GSTT1* e o fenótipo acetilador lento, de *NAT2*, na subpopulação masculina e para *CYP2D6*4* e *GSTP1(Ile105Val)*, na subpopulação feminina.

Duas combinações, *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)* e *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/G)* revelaram-se prevalentes entre populações. Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre doentes com a combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)* e o estadió, quando em associação com os hábitos tabágicos. A combinação das três variantes alélicas dos CYPs apresentou prevalência para *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G)* e *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)*. Estas revelaram associações estatisticamente significativas entre metastização, histologia e estadió.

As combinações *GSTP1(A/G)/GSTT1(neg)/GSTMI(posit)* e *GSTP1(A/A)/GSTT1(neg)/GSTMI(posit)* contribuem significativamente para o perfil “ser doente com cancro do pulmão”, quando em associação com sexo masculino e ser fumador. Uma análise individual de *GSTP1* demonstrou a sua importância para a caracterização histológica, em indivíduos do sexo masculino fumadores, evidenciando uma prevalência para o adenocarcinoma.

Os acetiladores lentos são prevalentes na população de doentes e revelaram associações estatisticamente significativas para histologia do tumor e metastização. Por regressão logística, a contribuição do fenótipo de NAT2 para o perfil “ser ou não doente” revelou um aumento de susceptibilidade deste com o fenótipo “acetilador lento”, quando em associação com o sexo masculino, consumo de álcool e cessação tabágica, por um período inferior a um ano antes do diagnóstico. Esta susceptibilidade é aumentada quando, a este modelo, associamos primeiro a combinação dos três génotipos das glutatonas e posteriormente a combinação dos três génotipos dos CYPs. Os três modelos conferem diferentes riscos para cada variável evidenciando diferentes interacções, responsáveis pela modulação da resposta do indivíduo à doença.

A proteína TP53 mutada revelou uma associação estatisticamente significativa com a localização do tumor, no lobo superior dos pulmões, a qual foi reforçada por combinação com *GSTP1(A/G)*.

Este estudo revela a importância da caracterização da população em estudos para determinação de génotipos que possam contribuir para a variabilidade individual e susceptibilidade para uma determinada condição. Controlar variáveis que caracterizam o indivíduo e avaliar a contribuição dos polimorfismos genéticos e dos tipos de exposição ambiental e ocupacional parecem ser vias relevantes para o sucesso deste tipo de estudos.

Este estudo revela ainda a importância da interacção entre genes. Avaliar genes individualmente seria descurar que cada ser humano é um “todo”. São as múltiplas contribuições das partes e a interacção entre elas que determinam o estado de saúde ou o desenvolvimento da doença.

Abstract

The complex interaction between environmental exposures and genetic factors challenges the understanding of the etiology of lung cancer.

As with other epithelial malignancies, lung cancers are believed to arise after a series of progressive preneoplastic lesions, as a consequence of the interaction between occupational or environmental exposures and individual susceptibility that might confers an intrinsic fragility.

Tobacco smoking has long been established as a risk factor for lung cancer, even though only around 20% of smokers develop the disease. Tobacco smoke contains several carcinogens including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), N-nitrosamines and heterocyclic amines which, after undergoing biotransformation, can originate DNA adducts involved in the initiation of carcinogenesis.

CYP1A1 and *CYP2D6* genes, as genes belonging to cytochrome P450 family involved in xenobiotics biotransformation, were studied. They codify enzymes acting in phase I of the biotransformation of carcinogens. Phase II enzymes, glutathione S-transferases (*GSTs*) and N-acetyltransferases 2 (*NAT2*) involved in conjugation and acetylation, respectively, were also studied.

Multiple genetic changes found in lung cancer tissues involve tumour suppressor genes, from which TP53 mutations have a central role. The high levels of TP53, detected by an immunohistochemical assay, were used as a biomarker to assess the presence of TP53 mutations and establish some associations with risk factors for lung cancer.

Ethical approvals were obtained from Ethical Committees of Coimbra University Hospitals and Faculty of Medicine.

Using PCR-RFLP and PCR multiplex, three allelic variants of CYP450 (*CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* and *CYP2D6*4*), as well as *NAT2* and *GSTP1 (Ile105Val)*, *GSTT1* e *GSTM1* (null alleles) were evaluated in two populations of Center Region of Portugal, one including patients with lung cancer (n=200) and another used as control population (n=247).

The combined analysis of all the alleles by logistic regression presented significative associations for *GSTT1* and slow acetylator phenotype from *NAT2* in male sub-population and for *CYP2D6*4* and *GSTP1 (Ile105Val)* in female sub-population.

Two combinations, *CYP1A1*2A(TT)/CYP1A1*2C(AA)* and *CYP1A1*2A(TT)/CYP1A1*2C(A/G)* were prevalent between populations. A statistical significant association was found between *CYP1A1*2A (TT) /CYP1A1*2C (AA)* and tumor stage (IV), when smoking habits were considered. Three combination for CYPs,

*CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G)* and *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)* were prevalent among patients. They revealed statistically significant associations with metastases, histology and the stage of tumor.

The combinations *GSTP1(A/G)/GSTT1(neg)/GSTMI(posit)* and *GSTP1(A/A)/GSTT1(neg)/GSTMI(posit)* contribute significantly for “lung cancer patient” profile when associated with male sex and smoking habits. An individual analysis for *GSTP1* reveals its importance for the histological characterization, in male smokers, revealing prevalence for adenocarcinoma.

Slow acetylators are prevalent in patient population and revealed a statistically significant association for tumor histology and metastization. By logistic regression, the contribution of NAT2 phenotype for the profile “being a patient” revealed higher susceptibility for patients with this phenotype, when associated with male sex, alcohol consumption and tobacco cessation for a period less than one year before the diagnosis. This susceptibility is increased when we associated to this model the three glutathione genotypes and later combined the three CYPs genotypes. The three models confer different risks for each variable, showing different interactions, responsible for modulation of individual response to disease.

TP53 mutated protein revealed a statistically significant association with tumour localization in the superior lobe of lungs, which was reinforced when combined with *GSTP1(A/G)*.

This study reveals the importance of the characterization of a population in studies designed to evaluate genotypes that might contribute to individual variability and consequent susceptibility to a specific condition. Controlling individual variables and evaluating the contribution of genetic polymorphisms and types of environmental and occupational exposures, seems to be relevant approaches for the success of this kind of analysis.

This study emphasizes the importance of gene interactions. Evaluate genes in an individual manner would despise each human being as a whole. The state of illness and the disease development are determined by the multiple contributions of the body parts and their interactions.

Lista de abreviaturas:

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AHH-Aril hidrocarboneto hidroxilase

AhR - aril hidroxilase

AVC - acidente vascular cerebral

BaP- benzo(a)pireno

BM - Brometo de Metilo

CYP450- Enzimas do citocromo P450

CYP1, CYP2, CYP3, CYP4- Citocromo P450 família 1, família 2, família 3 e família 4

CNV- “Copy number variant”

DBE - Dibromometano

DCM - Diclorometano

DME- Drug Metabolizing Enzymes / Enzimas metabolizadoras de drogas

DMSO - Dimetilsufóxido

Dp – Desvio Padrão

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

EDTA - Etilenodiaminotetracético

EPHX- Epóxido Hidrólases Microsossomais

FMUC - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

GSH - Glutathiona Reduzida

GSTs- Glutathionas S-transferases

HC- Hormona de Crescimento

HLA - Complexo de Histocompatibilidade

HMOX1-Heme- Monoxigenase- 1

HPA- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HUC -Hospitais da Universidade de Coimbra

IARC- International Agency for Research on Cancer

MAPEG - Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism”

MI - Metabolizador Intermédio

ML- Metabolizador Lento

MPO- Mieloperoxidase

MR - Metabolizador Rápido

MUR - Metabolizadores Ultra-Rápidos

NAT- N-acetiltransferases

NNK- 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona

NNN- N'-nitrosonornicotina

NUT - Nomenclatura das Unidades Territoriais

OE - Áxido de etileno

OMS- Organização Mundial de Saúde

OR – Odds Ratio

Pb – Par de Bases

PCR - Polimerase Chain Reaction

PCR - ARMS - PCR - Amplification-Refractory Mutation System

PCR-RFLP - PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

RON- Registo Oncológico Nacional

RORENO- Registo Oncológico Região Norte

RORCentro- Registo Oncológico do Centro

ROS- Reactive Oxygen Species/ Espécies Reativas de Oxigénio

SNP – Single Nucleotide Polymorphism”

TAE – Tampão (Tris-HCl+ Ácido Acético+ EDTA)

TBE – Tampão (Tris-HCl+ Ácido Borico+EDTA)

TCDD-2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina

UE – União Europeia

UMA - Unidade/Maço/Ano

INDICE

| | |
|--|-----------|
| Agradecimentos | 3 |
| Resumo | 5 |
| Abstract | 7 |
| Lista de abreviaturas | 9 |
| 1. Introdução | 15 |
| 1.1 Genes e cancro | 17 |
| 1.2. Genotóxicos e susceptibilidade para o cancro do pulmão | 19 |
| 1.3. Enzimas da fase I | 21 |
| 1.3.1. Polimorfismos de <i>CYP1A1</i> | 23 |
| 1.3.2. Polimorfismos de <i>CYP2D6</i> | 25 |
| 1.4. Enzimas da fase II | 27 |
| 1.4.1. Polimorfismos das glutationas | 28 |
| 1.4.1.1. O gene <i>GSTM1</i> | 30 |
| 1.4.1.2. O gene <i>GSTT1</i> | 30 |
| 1.4.1.3. O gene <i>GSTP1</i> | 31 |
| 1.4.2. Os polimorfismos <i>NAT 2</i> | 32 |
| 1.5. Genes de metabolismo na população Portuguesa | 34 |
| 1.6. Gene supressor tumoral <i>TP53</i> | 35 |
| 1.7. Objectivos | 36 |
| 2. Material e métodos | 39 |
| 2.1 Material | 41 |
| 2.1.1 Amostra da população controlo | 41 |
| 2.1.2 Amostra da população de doentes | 44 |
| 2.2. Métodos | 47 |
| 2.3 Caracterização Genotípica da População | 48 |
| 2.3.1 Extracção de ADN | 48 |
| 2.3.2 Quantificação do ADN extraído | 49 |
| 2.3.3 PCR | 50 |
| 2.3.4 Estudo do polimorfismo <i>GSTP1 Ile¹⁰⁵Val</i> | 51 |
| 2.3.4.1 PCR-ARMS | 51 |
| 2.3.4.2 PCR em tempo real | 52 |
| 2.3.4.3 Sequenciação dos produtos amplificados | 54 |
| 2.3.5 Estudo do polimorfismo dos genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> | 54 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.6 Estudo do polimorfismo do gene <i>CYP2D6</i> | 56 |
| 2.3.7 Estudo do polimorfismo do gene <i>CYP1A1</i> (alelos 2A e 2C) | 59 |
| 2.3.8 Estudo dos polimorfismos do gene <i>NAT2</i> | 62 |
| 2.4 Análise histoquímica do gene supressor tumoral <i>TP53</i> | 66 |
| 2.5 Análise Estatística | 67 |
| 3. Resultados | 69 |
| 3.1 Caracterização da população doente e da população controlo | 71 |
| 3.2 Estudo dos polimorfismos das enzimas das fases I e II. | 76 |
| 3.2.1 Estudo dos polimorfismos das enzimas da fase I: <i>CYP1A1*2A</i> , <i>CYP1A1*2C</i> e <i>CYP2D6*4</i> . | 84 |
| 3.2.2. Estudo dos polimorfismos das enzimas da fase II | 97 |
| 3.2.2.1 Glutationas S-transferases, <i>GSTP1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> | 97 |
| 3.2.2.2 Enzimas N-acetil transferases | 104 |
| 3.3 Estudo da contribuição das associações das enzimas da fase I e fase II para o cancro do pulmão. | 109 |
| 3.4 Estudo de associação entre CYPs, GSTs e a proteína mutada TP53. | 112 |
| 4 Discussão | 118 |
| 4.1 Caracterização da população | 120 |
| 4.1.1 Caracterização das populações controlo e de doentes | 122 |
| 4.1.2 Caracterização clínica da população de doentes | 128 |
| 4.2 Enzimas da fase I e II | 130 |
| 4.2.1 O citocromo P450- os genes <i>CYP1A1</i> e <i>CYP2D6</i> | 131 |
| 4.2.2 Polimorfismo das enzimas da fase II- Glutationas S-transferases (GSTs) e N-acetiltransferases (NAT-2) | 131 |
| 4.2.3 Envolvimento do gene <i>TP53</i> . Contribuição na ação das enzimas da fase I e II do metabolismo | 151 |
| 5. Conclusões | 154 |
| BIBLIOGRAFIA | 166 |
| Anexos | 186 |
| ANEXO A | 187 |
| ANEXO B | 192 |
| ANEXO C | 196 |
| ANEXO D | 199 |

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Genes e cancro

O cancro é uma doença multifactorial, o que traduz o envolvimento e interacção de diversos factores genéticos e ambientais no seu desenvolvimento. De entre os genes cuja mutação pode estar na origem de uma neoplasia, salientam-se os protooncogenes (por exemplo, os genes *MYC* ou *RAS*), os genes supressores tumorais (por exemplo, os genes *TP53* ou *RB*), os genes que codificam enzimas de reparação do ADN e os que codificam enzimas de metabolismo de genotóxicos (por exemplo, as famílias de genes das citocromo oxidases, das glutationas ou das N-acetiltransferases), bem como os genes envolvidos na apoptose (por exemplo, a família de genes *BCL*) [Danesi *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2011].

Os protooncogenes, por estimularem a proliferação celular, os genes supressores tumorais, por exercerem um efeito inibitório da proliferação celular e os genes da apoptose, pelo seu envolvimento nos mecanismos de indução da morte celular programada e remoção de células com lesões graves do ADN, influenciam directamente a proliferação celular. Assim, as mutações ou alterações que ocorram em algumas regiões específicas destes genes podem estar directamente envolvidas na génese de fenótipos celulares neoplásicos [Risch *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2011].

As mutações génicas que tenham como resultado a inativação ou redução significativa da função das enzimas de reparação do ADN ou do metabolismo de genotóxicos, têm uma interferência indireta no desenvolvimento de fenótipos tumorais. As primeiras, por permitirem a acumulação de lesões do ADN das quais alguma ou algumas se podem localizar em genes envolvidos no controlo da proliferação celular e as segundas, como potenciais modificadores do risco para o cancro, por acumulação e prolongamento no tempo da acção de genotóxicos sobre o ADN e um consequente aumento de risco para a ocorrência de mutações, uma vez que estas podem atingir genes envolvidos no controlo da proliferação celular [Risch *et al.*, 2008].

São diversas as mutações do ADN associadas ao desenvolvimento de um fenótipo neoplásico, desde mutações pontuais, deleções, duplicações ou translocações, a alterações de natureza epigenética, como a hipermetilação da sequência promotora de um gene. Como causas, relevem-se os erros ocorridos durante a replicação do ADN e que escapam aos mecanismos de verificação da fidelidade da replicação e à reparação das lesões do ADN, bem como a exposição a quantidades excessivas de mutagénios ambientais e a presença de inflamação crónica [Risch *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2011].

Os diferentes tipos de tumores têm diferentes espectros de mutações. Alguns têm uma diversidade reduzida de mutações associadas ao desenvolvimento e progressão do tumor, enquanto outros, como o cancro do pulmão, evidenciam um espectro alargado de mutações associadas ao seu desenvolvimento e progressão [Douglas *et al.*, 2000; Butcher *et al.*, 2012].

As mutações podem ser herdadas ou adquiridas. Nas condições hereditárias há uma mutação presente em todas as células do organismo que cria, em alguns tecidos, suscetibilidade aumentada para o desenvolvimento de cancro. Quando as mutações são adquiridas, estas apenas estão presentes nas células somáticas que derivam da célula em que ocorreu a mutação que deu origem à desregulação inicial da proliferação [Minna *et al.*, 2002; Regateiro *et al.*, 2003].

Para a generalidade dos tumores sólidos, a carcinogénese é um processo que se desenvolve por acumulação de múltiplas alterações de natureza genética e epigenética, desde a mutação responsável pela desregulação inicial da proliferação celular, até ao fenótipo metastático [Risch, 2001; Carlson *et al.*, 2003; Deeken *et al.*, 2007]. O período de tempo correspondente ao desenvolvimento e progressão tumoral até à metástase pode ter uma extensão média de 17 anos, como é o caso do cancro do cólon [Jones *et al.*, 2008].

Assim, pode-se afirmar que o cancro é uma “doença de genes”.

Como resultado das alterações genéticas sofridas, as células cancerosas possuem características próprias, de que se destacam a autosuficiência na produção de moléculas que estimulam a proliferação celular, a insensibilidade a estímulos inibitórios da proliferação, uma elevada instabilidade genética e cromossómica, a desregulação da apoptose com evasão das vias conducentes à morte celular programada (apoptose), um

potencial proliferativo ilimitado por estabilização do comprimento dos telómeros (imortalização), a capacidade de invasão de tecidos vizinhos e de metastização e a capacidade angiogénica [Douglas *et al.*, 2000; Risch, 2001; Caulin *et al.*, 2011].

1.2. Genotóxicos e susceptibilidade para o cancro do pulmão

O cancro do pulmão assume uma relevância particular em Oncologia, por ser a primeira causa de morte por cancro, a nível mundial, por provocar uma mortalidade elevada e não haver procedimentos de rastreio efetivos.

O fumo do tabaco é a causa de cancro do pulmão reconhecida há mais tempo e a que se encontra melhor estudada, assumindo-se como factor de risco [Doll *et al.*, 1950; DeMarini, 2004; Hrubec *et al.*, 2010]. Para além do fumo do tabaco, estão ainda identificadas outras causas para o seu aparecimento, tais como a exposição ocupacional a carcinogénios, a exposição a poluentes ambientais genotóxicos e a radiação [Wistuba *et al.*, 2002; Hecht, 2003].

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 25% dos casos de cancro do pulmão ocorrem na ausência de hábitos tabágicos [Ferlay *et al.*, 2008]. No entanto, a percentagem de indivíduos não fumadores que desenvolve cancro do pulmão é variável, sendo função das regiões consideradas, sobretudo para o sexo feminino. A frequência do diagnóstico é mais elevada na Ásia, seguindo-se os Estados Unidos da América e depois a Europa [Waxman *et al.*, 2002; Ferlay *et al.*, 2008].

O fumo do tabaco é a causa mais frequente de cancro do pulmão, estando o risco e a severidade relacionados com a duração e a intensidade da exposição ao fumo do tabaco [Hrubec *et al.*, 2010].

Segundo a Agência Internacional para a Investigação do Cancro, são mais de 60 os carcinogénios presentes no fumo do tabaco, de que são exemplos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, as N-nitrosaminas, as aminas aromáticas ou os aldeídos. A exposição continuada aos carcinogénios pode provocar alterações visíveis a nível cromossómico, como sejam ganhos ou perdas de material cromossómico (aneuploidia, deleções, translocações não recíprocas), e de nível molecular, com mutações que se

traduzem na alteração de uma ou várias bases nucleotídicas da sequência de ADN [Wistuba *et al.*, 2002].

A inactivação e eliminação dos carcinogénios requer, para a grande maioria, a intervenção das enzimas de metabolismo de xenobióticos [Wistuba *et al.*, 2002; Hecht, 2003; DeMarini, 2004]. Contudo, é bem conhecida a variabilidade inter-individual no que respeita à genotoxicidade resultante da exposição a agentes ambientais ou a determinados fármacos. Esta variabilidade é o reflexo da diversidade genética que caracteriza a espécie humana, em termos de polimorfismos genéticos. Em consequência, são esperados diferentes graus de predisposição genética individual para a ocorrência de doenças resultantes da exposição a xenobióticos e, no caso particular do fumo do tabaco, aos carcinogénios presentes [Zhang *et al.*, 2006].

A variabilidade na resposta a tóxicos ambientais ou a fármacos está intimamente associada à acção de enzimas da fase I e II das reacções de biotransformação de xenobióticos. Neste processo de biotransformação, os xenobióticos são metabolicamente activados pelas enzimas da fase I e posteriormente metabolizados pelas enzimas da fase II, em compostos hidrofílicos inactivados para posterior excreção [Zhang *et al.*, 2006].

As enzimas da fase I, do qual faz parte o sistema multi-enzimático do citocromo P450, podem activar, metabolicamente, pró-carcinogénios, conduzindo à formação de intermediários electrofílicos genotóxicos ou podem inactivar carcinogénios, estando intimamente associadas ao processo de desintoxicação [Gresner *et al.*, 2007].

As enzimas da fase II compreendem as enzimas de conjugação, incluindo diversas transferases tais como as glutationas S-transferases (GSTs) e as arilamina N-acetiltransferases (NAT), as quais convertem os compostos electrofílicos produzidos na fase I, em compostos mais hidrofílicos, de forma a serem excretados para o exterior [Alberg *et al.*, 2006; Rodriguez-Antona *et al.*, 2006].

Diferenças genéticas na regulação, expressão e actividade dos genes da fase I e II das enzimas metabolizadoras de drogas (DME), bem como dos receptores que controlam os níveis de actividade destas enzimas, podem ser relevantes para estabelecer graus de susceptibilidade para o cancro face à exposição a um genotóxico, bem como para avaliar o poder tóxico e/ou carcinogénico das diversas substâncias químicas

ambientais. Esta variabilidade genética pode também afetar a resposta a algumas terapêuticas, condicionando o seu sucesso ou insucesso [Alberg *et al.*, 2006; Rodriguez-Antona *et al.*, 2006; Božina *et al.*, 2009].

Após a biotransformação, muitos dos compostos eletrofílicos resultantes são tóxicos para as células dos pulmões e reagem com as moléculas de ADN, podendo iniciar o processo da carcinogénese. Neste processo de múltiplos passos, as moléculas pró-carcinogénicas podem, quando metabolizadas para carcinogénios, formar ligações covalentes com as moléculas de ADN originando aductos e, possivelmente, interferir nos mecanismos de reparação responsáveis pela sua remoção [Peluso *et al.*, 2004; Alberg *et al.*, 2006; Mackinnon *et al.*, 2010].

As mutações do ADN provocadas pelos genotóxicos têm efeitos particularmente graves quando ocorrem em genes envolvidos na regulação da proliferação celular, como o gene *TP53*. De facto, a proteína codificada por este gene está envolvida em múltiplos mecanismos e funções celulares como a diferenciação, o controlo da proliferação, a identificação de lesões do ADN, a paragem do ciclo celular para a reparação do ADN e a apoptose o que justifica a frequência com que se encontram anomalias da sua função, em casos de cancro [Freed-Pastor *et al.*, 2006].

1.3. Enzimas da fase I

As principais enzimas da fase I intervenientes no metabolismo de xenobióticos são o citocromo P450 (CYP450), as epóxido-hidrolases microsossomais (EPHX) e as flavina-monooxigenases (tais como a heme-monooxigenase-1 (HMOX1) e a mieloperoxidase (MPO)).

O citocromo P450 é um sistema multienzimático capaz de catalisar a biotransformação oxidativa de substratos endógenos tais como esteróides, ácidos gordos ou prostaglandinas e substratos exógenos como sejam fármacos, toxinas vegetais e compostos químicos ambientais [Božina *et al.*, 2009]. Três das dezoito famílias que o constituem são responsáveis por este metabolismo, estando identificadas como CYP1, CYP2 e CYP3. Estas são responsáveis por 70% a 80% do metabolismo dos fármacos utilizados na actividade clínica e participam no metabolismo de um elevado número de xenobióticos químicos. As enzimas CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 estão,

principalmente, envolvidas no metabolismo dos fármacos, enquanto que as isoformas mais importantes responsáveis pela biotransformação de compostos químicos e pela activação metabólica de pró-carcinogénios são a CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E6 e, de novo, a CYP3A4 [Božina *et al.*, 2009].

Fatores intrínsecos e extrínsecos podem influenciar a expressão e função destas enzimas, sendo a maioria destas controlada por múltiplos fatores, em que se incluem os polimorfismos genéticos, mecanismos epigenéticos e fatores de natureza não genética. Os polimorfismos originam fenótipos com diferentes capacidades de metabolização.

A variabilidade genética ocorre por perda ou ganho de função [Wright *et al.*, 2010]. Relativamente à perda de função, esta afeta preferencialmente o “splicing” e a expressão génica. O ganho de função está diretamente associado a uma variação do número de cópias (CNV) com um aumento do número de cópias funcionais do gene, como é o caso de *CYP2D6* e *CYP2A6*, bem como de variantes ao nível da região promotora, de que são exemplo o *CYP2B6* e *CYP2C19*, ou variantes dos aminoácidos produzidos, permitindo o aumento do volume de substratos, como é o caso de *CYP2B6* e *CYP2C8* [Božina *et al.*, 2009]. Perdas totais de função ou duplicações génicas funcionais são, no entanto, acontecimentos raros para determinados genes destas famílias como é o caso de *CYPs 1A1, 1A2, 2C8, 2E1, 2J2 e 3A4* [Rodriguez-Antona *et al.*, 2006].

Do ponto de vista da farmacologia clínica, a perda de atividade enzimática conduzirá a uma perda de capacidade de metabolização do fármaco alvo e a um aumento da sua concentração ao nível plasmático com uma eventual e subsequente toxicidade, enquanto que um ganho na função resultará na diminuição rápida dos seus níveis plasmáticos e a uma redução do efeito terapêutico esperado [Božina *et al.*, 2009].

Fenómenos epigenéticos tais como a metilação do ADN, envolvida na regulação da expressão génica, e alterações ao nível das proteínas histónicas que afetem a acessibilidade dos genes para a transcrição, têm repercussões na atividade enzimática. Estes fenómenos são reversíveis, podendo ser específicos de determinados tecidos e serem influenciados por variáveis dependentes do indivíduo, tais como o sexo, a idade ou fatores ambientais [Hung *et al.*, 2003; Ingleman-Sundberg, 2005; Risch *et al.*, 2008].

Como exemplo, refira-se a metilação do promotor do gene *CYP1A1* que parece ser menor nos grandes consumidores de tabaco e mais elevada nos não fumadores [Kawajiri *et al.*, 1990]. O sexo, tal como a idade e as doenças de um indivíduo, é um fator não genético que parece afetar a atividade destas enzimas, muito embora diversos estudos realizados apresentem resultados contraditórios [Hawajiri *et al.*, 1990, Hung *et al.*, 2003, Wright *et al.*, 2010]. Por exemplo, a maioria de estudos clínicos dirigidos para o gene *CYP3A4*, indica que as mulheres metabolizam os seus substratos (por exemplo, a antipirina, o alfentanil, a eritromicina, o midazolam ou o verapamil) mais rapidamente do que os homens, registando-se nestas, uma disponibilidade de proteína duas vezes superior [Wolbold *et al.*, 2003]. Relativamente à idade verificou-se que os indivíduos mais velhos têm uma menor capacidade de metabolizar fármacos sendo lenta a sua eliminação ao nível plasmático [Egger *et al.*, 2005]. Tal é particularmente relevante no caso dos anti psicóticos, antidepressivos, anticoagulantes e betabloqueantes [Egger *et al.*, 2005]. Refira-se, no entanto, que este decréscimo de atividade parece não estar associado a uma diminuição da atividade ou da expressão das enzimas metabolizadoras de fármacos, mas sim a uma interação entre fármacos, a uma redução do aporte de sangue ao fígado e a uma redução da função renal associadas ao envelhecimento. A atividade da grande maioria destas enzimas está dependente de ação indutora de diversos fatores, com excepção de *CYP2D6* para o qual não são conhecidos fatores de indução. Os indutores actuam acionando a resposta ao “stress” celular conduzindo a um aumento da expressão do gene que, conseqüentemente, aumentará a eliminação de fármacos e de xenobióticos, seus substratos [Wen J *et al.*, 2011].

1.3.1. Polimorfismos de *CYP1A1*

O gene *CYP1A1*, localizado em 15q24.1, possui uma sequência bem conservada do ponto de vista evolutivo. É expresso maioritariamente em tecidos extra-hepáticos, preferencialmente em tecidos epiteliais [Wen J *et al.*, 2011], nomeadamente nos pulmões. É induzido por numerosos xenobióticos que atuam como ligandos do receptor da aril hidroxilase (AhR) tais como o metilcolantreno e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), a β -naftoflavona e dioxinas, bem como indutores atípicos como sejam o omeprazol e a primaquina, os quais não se ligam ao receptor da AhR [Shah *et al.*, 2008].

Os substratos deste gene compreendem hidrocarbonetos policíclicos planares, tais como o benzo[a]pireno e outros pró-carcinogénios tais como os arilarenos, os nitroarenos e as arilaminas presentes, nomeadamente, nos alimentos grelhados, nos compostos resultantes da combustão industrial e no fumo do tabaco. Estas moléculas são bioativadas e transformadas em intermediários reactivos e em carcinogénios, pelas enzimas codificadas pelos genes da família dos *CYP1*, os quais se ligam à molécula de ADN, formando aductos [Danesi *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008].

Os polimorfismos deste gene não parecem ter grande impacto no metabolismo de fármacos, mas desempenham um papel importante na bioactivação, tendo sido implicados no desenvolvimento de diversas formas de cancro. Apresentam ainda uma acentuada variabilidade étnica, dificultando a realização de estudos de correlação entre populações [Bartsch *et al.*, 1992; Garte *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2008].

Foram identificados 11 alelos para o gene *CYP1A1* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>) com capacidade indutível e/ou aumento da actividade catalítica da enzima codificada, com consequente incremento da formação de aductos ao nível do ADN do tecido pulmonar [Kawajiri *et al.*, 1990; Shah *et al.*, 2008]. Com uma representatividade etnicamente muito variável, apenas quatro destes alelos têm sido alvo de estudos e avaliações nas populações. Destes, dois polimorfismos funcionais são expressos em populações de diversas etnias, nomeadamente a mutação pontual (SNP) originada pela substituição da base timina por citosina, na região 3' intrónica, originando o local de restrição da enzima Msp1 (T3801C; rs4646903) identificada pelo alelo *CYP1A1*2A* e a mutação resultante da substituição da base adenina por guanina, no nucleótido 2455, exão 7, originando a substituição do aminoácido isoleucina por valina, no codão 462 (*Ile462Val*, rs1048943) [Kawajiri *et al.*, 1996]. O alelo *CYP1A1*2C*, foi claramente associado com um aumento de atividade catalítica, 6 a 12 vezes superior, do 17 β -estradiol. Este alelo é mais frequente entre Asiáticos (18% a 25%) e Hispânicos, do que noutras populações, nomeadamente a Caucasiana (populações controlo: 7% a 13%) [Garte *et al.*, 2001; San Jose *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2011; Lopez Cima, 2012].

O alelo *CYP1A1*2C*, sendo um alelo raro na população caucasiana, tem sido detectado em associação com o primeiro, *CYP1A1*2A*. A presença, em concomitância destes dois alelos identifica a presença do alelo *CYP1A1*2B* [Shah *et al.*, 2008].

Dois outros alelos, *CYP1A1*3*, resultante da transição T3205C e *CYP1A1*4*, de que resulta a troca Thr461Asn, apesar de também associados a um aumento da atividade

catalítica, são extremamente raros na população Caucasiana. Este último, tem uma frequência de apenas 2% a 3% entre Caucasianos saudáveis e frequências ligeiramente superiores a 3%, em Caucasianos com cancro do pulmão [San Jose *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2011].

Diversos estudos envolvendo estes polimorfismos e o cancro do pulmão no sentido de avaliar a sua contribuição para a susceptibilidade para este cancro evidenciaram resultados frequentemente contraditórios [Rusin *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2011; Lopez Cima *et al.*, 2012].

1.3.2. Polimorfismos de *CYP2D6*

A subfamília *CYP2D*, localizada em 22q13.1, é constituída por quatro genes, três pseudogenes, respetivamente *CYP2D8P*, *CYP2D7AP* e *CYP2D7BP* e um gene activo *CYP2D6*, com elevada homologia sequencial [Zanger *et al.*, 2004]. O gene *CYP2D7* é expresso a nível hepático, tendo sido identificado o seu ARNm. No entanto, a presença de uma inserção no primeiro exão origina a ruptura da grelha de leitura, impedindo a expressão da proteína. O gene *CYP2D8P* é um pseudogene verdadeiro, com múltiplas inserções e deleções e sem abertura da grelha de leitura [Zanger *et al.*, 2004; Danesi *et al.*, 2008].

O gene *CYP2D6* é muito importante para o metabolismo dos fármacos, apesar da sua baixa representatividade hepática (cerca de 2%). A sua expressão ao nível pulmonar é controversa, embora importante para a explicação da ativação *in situ* da carcinogénese pulmonar. Este gene apresenta um grande número de variações estruturais. Neste, podem ocorrer cruzamentos desiguais entre genes homólogos, envolvendo determinadas sequências repetitivas, originando variantes com genes deleccionados, duplicados ou de alguma forma recombinados [Johansson *et al.*, 2011]. Existem mais de 80 variantes alélicas. Actuam sobre uma extensa gama de substratos, dos quais cerca de 15% a 25% são fármacos utilizados na actividade clínica, envolvendo quase todas as classes terapêuticas [Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2011].

A enzima *CYP2D6* possui uma grande afinidade por alcalóides e alguns pesticidas tais como o insecticida clorinado metoxicloro. Insecticidas como o paratião, clorpirifos e o diazinon sofrem bioactivação oxidativa, não só por intermédio da

enzima CYP2D6 como também pela CYP3A4, resultando, da sua acção, compostos mais activos e consequentemente mais tóxicos [Zanger *et al.*, 2004].

Uma vez que a enzima CYP2D6 não sofre indução por qualquer hormona, nem é regulada por qualquer agente ambiental, ao contrário de outras enzimas do citocromo P450, estes polimorfismos contribuem extensivamente para a variabilidade inter-individual da sua atividade [Sachse *et al.*, 1997; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007]. Esta variabilidade metabólica é traduzida, fenotipicamente, em diversas categorias, quer seja esta nula, diminuída, normal, aumentada ou de alguma forma alterada. Consequentemente, são identificados quatro fenótipos: “metabolizador lento” (ML), “metabolizador intermédio” (MI), “metabolizador rápido” (MR) e “metabolizador ultra-rápido” (MU). Apenas os alelos nulos originam o fenótipo ML, resultante de mutações pontuais ou pequenas inserções/deleções, com consequente interrupção da grelha de leitura ou “splicing” incorreto e formação de uma proteína truncada [Sachse *et al.*, 1997].

As variantes alélicas mais importantes são *CYP2D6*2XN*, com aumento da atividade catalítica por aumento do número de cópias, *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* e *CYP2D6*6*, com perda de atividade catalítica, *CYP2D6*5*, por perda total do gene e *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* e *CYP2D6*41*, com redução da actividade das enzimas codificadas (<http://www.cypalleles.ki.se/>) [Sachse *et al.*, 1997; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007].

As frequências alélicas encontradas evidenciam uma variabilidade de origem étnica, verificando-se por exemplo, que o alelo mais frequente (“wild type”) para *CYP2D6*1* apresenta uma frequência de 70% nos Caucasianos da América do Norte e de 35% nos Caucasianos Europeus. Para os MI, o alelo *CYP2D6*4* apresenta uma frequência entre 20% a 30% nas populações Europeias Caucasianas, embora esteja entre 18% a 29% para os Caucasianos da América do Norte, entre 0% a 0.51% para os Japoneses e 11% na população Turca [Neafsey *et al.*, 2009]. Este alelo *CYP2D6*4*, resulta de uma transição G para A (1846G>A) entre o intrão 3 e o exão 4, originando um “stop” codão prematuro, tendo como consequência a ausência de proteína no fígado [Sachse *et al.*, 1997]. Os restantes alelos nulos, nomeadamente *3, *5 e *6, apresentam frequências inferiores a 5% na maioria das populações, muito embora coletivamente,

estes alelos de baixa frequência, possuam uma contribuição significativa para o fenótipo [Sachse *et al.*, 1997].

O gene *CYP2D6* contribui extensivamente para a variabilidade interindividual no metabolismo de muitos antidepressivos, anti-psicóticos, analgésicos e fármacos anticancerígenos, afetando a sua farmacocinética e conduzindo, muitas vezes, a reações adversas a drogas, ou mesmo a uma não resposta [Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007]. A ausência de atividade enzimática, com a consequente redução do efeito terapêutico observado nos ML, ou o aumento do efeito terapêutico no caso dos MU, recomenda o recurso à fenotipagem/genotipagem de *CYP2D6*, pelo menos no tratamento com determinados fármacos, como é o caso da codeína e dos anti-depressivos [Sachse *et al.*, 1997, Gasche *et al.*, 2004]. Adicionalmente às consequências terapêuticas resultantes da oxidação polimórfica dos fármacos, muitos dos substratos deste gene e também alguns outros não identificados como tal, atuam como inibidores competitivos para a enzima conduzindo, ocasionalmente, a interações graves. Estes inibidores originam um bloqueio no metabolismo de fármacos co-administrados, com consequente alteração do fenótipo, muitas vezes de MR para ML ou MI (fenómeno designado por fenocópia) [Zanger *et al.*, 2004; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2011].

Assim, a genotipagem deste gene parece ser fundamental não só pelo carácter preditivo relativo à farmacocinética mas também para prevenção de reações adversas e êxito do tratamento. Parece ser relevante o facto de o efeito resultante de um polimorfismo sobre a atividade catalítica de uma enzima poder ser específico do substrato [Neafsey *et al.*, 2009].

1.4. Enzimas da fase II

Nesta secção abordam-se as vias da conjugação e da acetilação.

As três principais vias de conjugação da fase II do metabolismo são a sulfatação, a glucuronidação e a conjugação pelas glutatonas.

A conjugação pode ocorrer diretamente na molécula substrato ou após esta ter sido biotransformada pelas enzimas da fase I, através da adição de grupos funcionais ou por alteração da conformação para a sua exposição.

As reações de conjugação alteram as propriedades físico-químicas dos substratos, aumentando o seu peso molecular bem como a solubilidade aquosa e introduzem uma carga negativa à molécula. Como resultado, as moléculas têm tendência a ser muito pouco permeáveis ao nível membranar, sendo a sua excreção hepática mediada por um transportador [Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006; Omiecinski *et al.*, 2011].

A sulfatação hepática de xenobióticos conduz a um aumento da hidrofiliabilidade molecular permitindo a excreção biliar ou o efluxo através da membrana basolateral hepática, para posterior excreção renal.

Como consequência da ação do ácido glucurónico, as reações de glucuronidação complementam as de sulfatação, na medida em que ocorrem na mesma região da molécula, sendo no entanto prevalentes em concentrações elevadas do substrato, quando as enzimas da via da sulfatação se encontram saturadas ou por depleção do cofactor.

A via da acetilação, bem como a via da metilação que não será abordada, são vias metabólicas menos comuns para os xenobióticos, resultando numa diminuição da solubilidade em meio aquoso [Omiecinski *et al.*, 2011].

1.4.1. Polimorfismos das glutathionas

As reações de conjugação pelas glutathionas-S-transferases (GSTs), envolvem substratos eletrofílicos. A metabolização por esta via evita a sua ligação covalente a macromoléculas intercelulares [Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006]. Foram identificadas três famílias distintas destas isoenzimas.

A primeira família corresponde às GSTs citosólicas ou solúveis, as quais são dímeras. Têm uma localização com predominância hepática, muito embora se encontrem em quase todos os tecidos, e estão envolvidas na biotransformação de xenobióticos e endobióticos tóxicos [Hayes *et al.*, 2000]. São as principais responsáveis pela conjugação de compostos não polares com a glutathiona reduzida (GSH), tais como xenobióticos, fármacos e pesticidas (portadores de centros eletrofílicos) de modo a formar compostos hidrossolúveis conjugados, facilmente excretáveis. Dentro dos substratos electrofílicos das glutathionas transferases estão incluídos os haletos de

alquila, os epóxidos, os compostos α,β -insaturados (quinonas, aldeídos, cetonas, lactonas), os haletos de arila e nitro aromáticos. Regulam diversos processos celulares por via de interações proteína-proteína, envolvendo atividades que incluem isomerização, trocas de grupos bissulfeto e tiólise [Torres *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2011; Board *et al.*, 2013]. Foram identificados 17 genes, subdivididos em sete classes distintas, designadas por Alfa, Pi, Mu, Sigma, Theta, Omega e Zeta. Estas sete classes são habitualmente agrupadas em função das similaridades entre estruturas e entre resíduos no local de ligação de GSH, utilizado para formar o anião tiolato GS⁻. O primeiro grupo compreende as classes Alfa, Pi, Mu e Sigma, as quais utilizam um resíduo de tirosina localizado próximo do grupo N-terminal para ativar GSH, enquanto que Theta, Omega e Zeta formam o segundo grupo, utilizando um resíduo de serina ou cisteína [Strange *et al.*, 2001].

A segunda família é constituída por 6 proteínas microsossomais, as quais não possuem semelhanças ao nível da estrutura primária com as proteínas citosólicas, são triméricas, e atuam principalmente no metabolismo do ácido araquidónico. Em consequência disso, são habitualmente designadas por “membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism - MAPEG”. Têm sido, ainda, implicadas no metabolismo e biotransformação de fármacos em mamíferos [Higgins *et al.*, 2011].

Por fim, a família das GST mitocondriais, constituída por uma classe de transferases distinta das GST citosólicas e microsossomais, a classe Kappa, GSTK1. Como tem sido referido por diversos estudos, esta família parece ter evoluído de modo distinto das restantes duas [Strange *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2006].

Diversos tipos de variação alélica têm sido identificados nas classes Alfa, Mu, Pi, Theta e Zeta, ao contrário das classes Kappa, Sigma e Omega nas quais tal não é reconhecido. De igual forma, pouco se sabe sobre os polimorfismos nas MAPEG [Hayes *et al.*, 2000]. Estudos de indução têm sugerido que as GSTs são controladas por receptores tais como o receptor do androstano, o receptor pregnane X e pelo receptor da aril-hidrocarboneto [Hayes *et al.*, 2000; Higgins *et al.*, 2011].

1.4.1.1. O gene *GSTM1*

A classe Mu é constituída por cinco genes, *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5*, localizados num “cluster” no braço curto do cromossoma 1 (1p13.3). Os produtos génicos desta classe parecem demonstrar alguma especificidade ao nível dos tecidos, nomeadamente o *GSTM1-1* é expresso preferencialmente ao nível hepático, o *GSTM2-2* ao nível muscular e o *GSTM3-3* ao nível cerebral e testículos. Foram descritas duplicações génicas bem como três variantes alélicas para *GSTM1*, sendo que uma delas é um alelo nulo, *GSTM1*0*. As duplicações e a variante nula apresentam acentuadas alterações na atividade catalítica direcionadas para o metabolismo do óxido de trans-estilbeno e outros epóxidos. As outras duas variantes alélicas *GSTM1*A* e *GSTM1*B*, codificam proteínas catalíticamente idênticas [Hayes *et al.*, 2000].

O gene *GSTM3* está localizado em 1p13.3, numa posição reversa à dos restantes genes, possui dois alelos *GSTM3*A* e *GSTM3*B*, e tem sido referido como estando em “linkage disequilibrium” com *GSTM1*0* [Inskip *et al.*, 1995].

A deleção *GSTM1*0* tem sido estudada em diversas populações apresentando-se com elevada frequência em diversas etnias. Tem sido associada a suscetibilidade acrescida para diversas formas de cancro, surgindo como um dos mais relevantes, o que foi realizado em crianças com leucemia, cujos resultados evidenciaram uma associação significativa entre a deleção e a sobrevivência de crianças após tratamento com quimioterapia [Den Boer *et al.*, 1999].

1.4.1.2. O gene *GSTT1*

Existem apenas dois genes funcionais GSTs da classe *Theta*, o gene *GSTT1* e o gene *GSTT2*, localizados no cromossoma 22q11.2. O *locus* apresenta frequentemente uma deleção total do gene, *GSTT1*0*, bem como uma duplicação invertida de *GSTT2*, originando um pseudogene designado por *GSTT2p* ou *GSTT2b*. Estudos recentes reportaram uma deleção deste gene que resulta numa alteração da expressão de *GSTT2* [Zhao *et al.*, 2009].

Muito embora tenham sido identificados 18 SNPs, estes não têm sido alvo de intensos estudos. A deleção de *GSTT1-1*, *GSTT1*0*, ocorre entre 10% a 20% nas

populações estudadas. Esta deleção foi implicada num aumento da suscetibilidade para o cancro, após se ter evidenciado a sua incapacidade para conjugar GSH com hidrocarbonetos, nomeadamente dibromometano (DBE), diclorometano (DCM), óxido de etileno (OE) e brometo de metilo (BM) [Hayes *et al.*, 2000].

1.4.1.3. O gene *GSTP1*

A classe *Pi* é constituída por um único gene funcional, *GSTP1*, localizado em 11q13. Foram identificados dois SNP, *Ile105Val* e *Ala114Val*. Na presença de *Val105*, a enzima apresenta uma atividade catalítica sete vezes superior para os diol-epóxidos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), quando comparada com a enzima com *Ile105*. Como consequência de *GSTP1* se encontrar expresso em diferentes tumores, diversos estudos têm sido direcionados para uma possível associação deste com a resistência à terapêutica, bem como no envolvimento destes com a alteração no metabolismo de fármacos e impacto na suscetibilidade para diversos tipos histológicos de cancro [Hayes *et al.*, 2000; Higgins *et al.*, 2011; Board *et al.*, 2013].

A maioria dos estudos tem-se debruçado sobre o SNP *Ile105Val*, uma vez que o resíduo 105 contribui para a arquitetura do local de ligação hidrofóbico do substrato, no centro catalítico. Alterações encontradas entre *Val105* e *Ile105* relativamente à capacidade de conjugar derivados carcinogénicos dos diol-epóxidos provenientes dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, têm sido atribuídas a uma alteração do volume dos resíduos no “local H” e da sua hidrofobicidade. Estas diferenças na capacidade catalítica, entre *Val105* e *Ile105* relativamente a estes compostos químicos sugerem uma possível associação entre estes alelos e a suscetibilidade para o cancro. No entanto, outros fatores deverão estar implicados, pois apesar de diferenças de estabilidade e atividade evidenciadas por estas duas variantes, os resultados não têm sido consistentes [Sweeney *et al.*, 2000; Butkiewicz *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Matakova *et al.*, 2009; Pliarchopoulou *et al.*, 2012].

1.4.2. Os polimorfismos NAT 2

As enzimas N-acetiltransferases catalisam a acetilação de aminas aromáticas e hidrazinas, as quais incluem compostos carcinogêneos, dos quais são exemplo a 2-naftilamina, o 2-aminofluoreno, o 4-aminobifenil e a benzidina e fármacos tais como a isoniazida, dapsona, procainamida e sulfametazina [Hein *et al.*, 2006]. Este grupo de enzimas pode modular não só as atividades dos fármacos e atuar ao nível da sua eliminação como também estar envolvido na carcinogênese química, com a metabolização de aminas aromáticas como as piridinas, quinoxalinas e quinolinas produzidas durante a confeção do peixe e da carne, em consequência da pirolose de peptídeos [Gross *et al.*, 1999]. As aminas aromáticas, após N-hidroxilação pelas enzimas do citocromo P450 (fase I), sofrem O-acetilação pelas acetiltransferases, de que resultam compostos muito reativos que se ligam covalentemente à molécula de ADN, dando origem à iniciação da carcinogênese química [Gill *et al.*, 1998]. Estas enzimas são, ainda, responsáveis pela N-acetilação das hidrazinas, reação associada a uma desativação, e pela ativação, por O-acetilação, das aminas N-hidroxi-aromáticas e heterocíclicas [Gill *et al.*, 1998; Hein *et al.*, 2006].

As N-acetiltransferases humanas estão localizadas em 3 *loci*, um dos quais contém múltiplos codões de terminação prematura, identificando um pseudogene. Os dois outros genes, *NAT1* e *NAT2* estão localizados no cromossoma 8, em 8p22, sendo ambos expressos em codominância autossómica [Blum *et al.*, 1990]. Muito embora possuam cerca de 87% de homologia nas sequências nucleotídicas, estudos funcionais demonstraram diferenças significativas entre as duas isoenzimas que codificam [Windmill *et al.*, 2000]. A enzima codificada pelo gene *NAT1* metaboliza, preferencialmente, *p*-aminobenzoato e *p*-aminosalicilato. As variantes alélicas de *NAT1* são em menor número do que as do gene *NAT2* e estão associadas a uma elevada atividade enzimática. A atividade de *NAT2* parece ser preponderante ao nível hepático e do trato gastro-intestinal, enquanto que a enzima *NAT1* ocorre em diversos tecidos extra-hepáticos [Windmill *et al.*, 2000; Hein *et al.*, 2006].

O gene *NAT2* é polimórfico, com mais de 25 variantes alélicas descritas, as quais possuem entre uma a quatro substituições de um nucleótido. Os polimorfismos do gene *NAT2* resultam numa variabilidade da atividade catalítica da enzima, tendo sido referidas diversas associações entre estes e algumas doenças, nomeadamente cancro do

colon, mama e pulmão bem como asma alérgica [Nacak *et al.*, 2002]. Diversos estudos referem ainda que estas associações são mais intensas em grupos de fumadores [Taylor *et al.*, 1998]. Assim, os polimorfismos genéticos destas enzimas podem modificar o risco relacionado com a exposição a estes carcinogêneos alterando não só a sua expressão como a sua atividade nos tecidos.

Um extenso número de SNPs foi identificado no gene *NAT2*. Identificados como responsáveis por alterações nos resíduos de aminoácidos temos os SNPs: 111T>C (R197Q), 190C>T (R64W), 191G>A (R64Q), 341T>C (I114T), 364G>A (D122N), 411A>T (L137F), 434A>C (Q145P), 590G>A (R197Q), 803A>G (K268R), 854A>C (K282T), 857G>A (K268R) e 859T>C (I287T). Outros não resultam na troca de aminoácidos, como sejam 282C>T, 481C>T e 759C>T. Foi ainda referida uma deleção, 859T, resultando numa modificação da grelha de leitura. Várias combinações destes SNPs, descritos por Vatsis *et al.*, (1995) resultam nos diferentes alelos ou haplótipos deste gene, os quais são segregados em “clusters”. Estas variantes alélicas possuem um ou mais SNP que as caracterizam. O alelo *NAT2**4 é considerado um alelo “wild-type”, pela ausência de qualquer SNP, estando associado a um fenótipo acetilador rápido. Outras variantes alélicas, contendo 191G>A (R64Q), 341T>C (I114T), 590G>A (R197Q) ou 857G>A (K268R) estão associadas a um fenótipo acetilador lento [Hein *et al.*, 2006].

A expressão destes alelos varia entre diferentes etnias e localizações geográficas das populações [Wormhoudt, 1999]. Atualmente, têm sido recomendados painéis entre dois a sete SNPs do gene *NAT2* para inferir, com uma certa precisão, o fenótipo acetilador, nomeadamente para populações com ancestrais não europeus [Hein *et al.*, 2006]. No entanto, diversos estudos evidenciaram uma certa variabilidade intra-étnica o que interfere com a validade destes painéis em termos de capacidade preditiva do fenótipo. Por exemplo, o painel de três SNPs, 341T>C, 590G>A e 857G>A, prevê com uma precisão de 100% o fenótipo na população Japonesa e entre 98% a 99% na população de Brasileiros brancos. No entanto, nenhum painel de três SNPs conseguiu inferir com uma precisão superior a 91% o fenótipo acetilador nas populações de negros ou mulatos Brasileiros [Suarez-Kurtz *et al.*, 2012].

Esta variabilidade evidencia a heterogeneidade e diversidade encontrada ao nível da farmacogenómica e a vantagem que pode decorrer da adoção destes conhecimentos, na prática clínica, para a prescrição de medicamentos [Suarez-Kurtz *et al.*, 2012].

1.5. Genes de metabolismo na população Portuguesa

Em Portugal, diversos grupos têm desenvolvido trabalho no sentido de avaliar as frequências alélicas e genóticas destes genes na população em geral e determinar a associação de alguns polimorfismos com diversos tipos de doenças, de que são exemplo o cancro da laringe e do pulmão, as leucemias, a hipertensão arterial, o acidente vascular cerebral (AVC), a doença de Parkinson [Leite-Correia *et al.*, 2003; Lemos *et al.*, 2008; Correia *et al.*, 2009].

Dentro dos estudos realizados na população saudável, alguns evidenciaram um desvio das frequências alélica e genotípica encontradas para as populações do sul da Europa relativamente a diversos tipos de DME, comparativamente com as que foram encontradas em populações do Norte da Europa. Estes resultados parecem evidenciar uma “fronteira” entre as populações do norte e do sul, com as populações do sul da Europa a serem influenciadas pelas migrações de povos do Norte de África para a Península Ibérica. Estas migrações terão ocorrido através do estreito de Gibraltar, por volta do ano 700 AD [Moreira *et al.*, 1996; Suarez-Kurtz *et al.*, 2012]. A similaridade de frequências entre países do sul da Europa, nomeadamente da Península Ibérica expressa-se sobretudo para o gene *CYP2D6* com expressão de metabolizadores ultra-rápidos (MUR) e com duplicação do gene [Correia *et al.*, 2009].

Relativamente aos estudos comparativos com populações de indivíduos doentes, foram avaliadas possíveis associações entre o polimorfismo das enzimas da fase I, *CYP1A1*, e o cancro do pulmão [Mota *et al.*, 2010]. Ainda em relação ao cancro do pulmão refiram-se os estudos de Moreira *et al.*, (2003), o qual demonstrou uma ausência de correlação entre o alelo nulo de *GSTM1* e o aumento de susceptibilidade para o cancro do pulmão [Leite-Moreira *et al.*, 2003]. A associação dos polimorfismos de *CYP2D6*, *CYP1A1* e das enzimas da fase II, *GSTM1*, *GSTP1* e *NAT2*, com o aumento da suscetibilidade para outros tipos de doença foi também estudado. Os estudos de Vilar *et al.*, (2007) evidenciaram a associação da doença de Parkinson com o

fenótipo metabolizador rápido de *CYP2D6* e a variante alélica *GSTP1*B*. Esta associação mostrou ser particularmente forte no grupo de indivíduos com idades superiores a 69 anos [Vilar *et al.*, 2007].

Leite-Moreira *et al.*, (2003) mostraram a associação do polimorfismo T6235C, do gene *CYP1A1*, com um aumento do risco para AVC enquanto Varzim *et al.*, (2004) evidenciaram o polimorfismo Msp1 de *CYP1A1* como um potencial marcador genético de susceptibilidade para o cancro da laringe, especialmente no grupo de fumadores. Em doentes com leucemia, foi demonstrado um risco aumentado para pacientes com metabolismo rápido de *CYP2D6* mas não para os genes *GSTM1* e *NAT2* [Lemos *et al.*, 1999].

Actualmente, o estudo relativo aos polimorfismos tem sido direccionado para a avaliação das associações entre as variantes alélicas dos genes envolvidos nos mecanismos de reparação da molécula de ADN e diversos tipos de cancro, tais como o cancro cervical, da próstata e pulmão [Nogueira A *et al.*, 2009].

1.6. Gene supressor tumoral *TP53*

O gene supressor tumoral *TP53* está localizado no cromossoma 17, em 17p13. Codifica a proteína nuclear *TP53*, que atua como fator de transcrição em relação a mais de 50 genes alvo diferentes. É também conhecida como “guardião do genoma”, uma designação que reflete o seu papel central na manutenção da estabilidade da informação genética ao longo das divisões celulares. Para cumprir esta função, a proteína *TP53* está envolvida nos processos de deteção de lesões do DNA, de paragem do ciclo celular, de reparação do DNA e, quando as lesões do DNA têm uma extensão e gravidade que não permite a reparação, na indução da apoptose. Na ausência de moléculas de *TP53* funcionais, a paragem do ciclo celular não ocorre após lesões do DNA, pelo que podem ser replicadas as mutações adquiridas nas células filhas. Se as lesões tiverem ocorrido em genes implicados no controlo da proliferação celular e forem patogénicas, podem dar início à formação de um tumor [Toledo, 2008].

As mutações do gene *TP53* são as alterações mais comumente encontradas nas neoplasias humanas. A frequência com que se deteta proteína *TP53* mutada no cancro

do pulmão é diversa, consoante o tipo de tumor, tendo-se registado em 33% dos casos de adenocarcinoma e em 70% dos casos de carcinomas de pequenas células

Na ausência de mutações do gene *TP53*, a concentração celular da proteína correspondente é baixa, devido à sua rápida degradação, o que não acontece com a proteína mutada, podendo esta característica ser usada para identificar a presença de mutações em *TP53*.

Sendo as mutações do gene *TP53* frequentes, observa-se uma elevada prevalência de transversões de GC para TA [<http://p53.free.fr/index.html>]. Ao contrário do que se observa noutros tipos de cancro que não estão associados com o fumo do tabaco, a frequência das transições é menor no cancro do pulmão. A maior frequência de transversões poderá ter a ver com a exposição aos produtos resultantes do metabolismo do benzo(a)pireno, para os quais foi detectada a capacidade de formarem aductos a nível dos codões 157, 248 e 273 do gene *TP53* [Pfeifer *et al.*, 1998].

O risco relativo para a ocorrência de mutações em domínios específicos do gene *TP53* em doentes com cancro do pulmão aumenta com o consumo de tabaco [Clavez *et al.*, 2005] Assim, a percentagem de casos em não fumadores foi de 47.5%, de 55.6% em ex-fumadores e de 77.4% em fumadores activos.

As mutações no gene supressor tumoral *TP53* podem ocorrer em fumadores crónicos, antes de qualquer evidência de neoplasia e podem ser indicativas de um risco aumentado de desenvolvimento de cancro do pulmão ou de doença precoce [Wistuba *et al.*, 2002].

1.7. Objectivos

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular permitiu aumentar a capacidade de avaliação de todo o processo da tumorigénese e os fenómenos nela envolvidos, nomeadamente as alterações genéticas e epigenéticas. Estudos iniciais demonstraram ser possível definir uma classificação sistematizada e reprodutível, de forma a obter grupos com prognóstico clínico e histológico, baseados no perfil da expressão génica [Zanger *et al.*, 2004]. Estes avanços da biologia molecular proporcionaram oportunidades únicas para o desenvolvimento de terapias

direccionadas, conduzindo ao desabrochar de uma nova área da terapêutica. Assim, a análise das alterações moleculares tem vindo a adquirir uma importância crescente, representando a sua integração como exame patológico e molecular de rotina, um desafio para o diagnóstico, classificação e escolha da terapia adequada [Risch *et al.*, 2001].

Estudos epidemiológicos evidenciaram que esta variabilidade individual poderá contribuir para uma suscetibilidade aumentada para o cancro. Diferenças interindividuais na resposta após exposição a substâncias tóxicas, cancerígenas ou não, têm sido atribuídas aos polimorfismos hereditários do metabolismo, quer sejam do citocromo P450 (CYP450), nomeadamente CYP2D6 e CYP1A1, das glutationa-S-transferases (GSTs) ou das N-acetiltransferases [Moreira *et al.*, 1996].

Este trabalho tem como objectivo:

1. Estudar, numa população de doentes com neoplasia pulmonar, da Região Centro do País, possíveis associações entre polimorfismos dos genes que codificam enzimas da fase I do metabolismo de xenobióticos (CYP2D6 e CYP1A1) e da fase II (GSTP1, GSTT1, GSTM1 e NAT2), e diferentes variáveis demográficas e clínicas, bem como compará-las com os resultados obtidos na população controlo;
2. Avaliar as interações gene-gene e gene-factores ambientais, por forma a detectar eventuais efeitos modificadores do risco para o cancro do pulmão determinados pela presença dos polimorfismos considerados isoladamente ou em combinação e ainda quando conjugados com os diversos factores ambientais, de modo a identificar associações que permitam definir grupos com risco acrescido para desenvolver cancro do pulmão;
3. Identificar associações entre a proteína mutada do gene supressor tumoral *TP53* e o agravamento das características clínicas encontradas nos doentes, na altura do diagnóstico, bem como associações entre o primeiro e os polimorfismos dos diversos genes estudados.

Capítulo II

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e métodos

2.1. Material

O material em estudo compreende duas amostras da população portuguesa, caucasiana, da zona centro de Portugal continental. As amostras dizem respeito a dois grupos de doentes que deram entrada no Serviço de Pneumologia, dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). O primeiro, a população de doentes, a quem foi diagnosticado cancro do pulmão e o segundo grupo de indivíduos, a população controlo, cujo diagnóstico confirmou a ausência de cancro.

Os doentes abordados (População controlo: N=247; População de doentes: N=200) aceitaram colaborar neste estudo, tendo respondido a um questionário realizado pela assistente hospitalar graduada de Pneumologia. O sigilo foi garantido. O questionário envolveu a obtenção de dados demográficos e clínicos, com informação relativa à altura do diagnóstico.

Este estudo teve a aprovação das comissões de ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra e da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2.1.1. Amostra da população controlo

A população de referência ou controlo é constituída por indivíduos (N=247) que foram internados no Serviço de Pneumologia, dos Hospitais da Universidade de Coimbra, na mesma altura que os indivíduos da população de doentes, mas sem diagnóstico de qualquer tipo de neoplasia. Dos 247 indivíduos que constituem esta população, 244 (98,8%) foram diagnosticados com doenças do foro respiratório,

nomeadamente 146 (59,8%) com insuficiência respiratória, 61 (25,0%) com infeções respiratórias, 30 (12,4%) com doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), 4 (1,6%) com fibrose pulmonar idiopática e 3 (1,2%) com silicose (Anexo D). No grupo dos indivíduos com infeção respiratória 44 (17,8%) foram diagnosticados com pneumonia. Dos 243 indivíduos avaliados, apenas 19 (7,2%), afirmaram ter familiares em primeiro grau com diagnóstico de cancro (Anexo B). Considerando a população em função dos seus hábitos tabágicos verifica-se que a prevalência de indivíduos com história familiar de cancro ocorre na subpopulação de não fumadores, 14 (9,7%), e para a subpopulação feminina 11 (12,4%) (tabela B.3, em Anexo B).

A população controlo apresenta uma média de idades de aproximadamente 71 anos ($\sigma = 11,24$) e uma amplitude amostral que varia dos 40 anos aos 97 anos (Tabela A.4, em Anexo A).

Tabela 2.1- Distribuição das idades para ambos os sexos, na população controlo.

| População Controlo (N=247) | Idade (anos) | |
|-------------------------------|----------------|-----------------|
| | Homens (N=156) | Mulheres (N=91) |
| Média | 72,1±10,20 | 68,9±11,93 |
| Moda | 78 | 58 |
| Máximo | 97 | 93 |
| Mínimo | 40 | 41 |
| Relação H/M | 1,71 | |
| População Doentes (N=200) | Idade (anos) | |
| | Homens (N=149) | Mulheres (N=51) |
| Média | 63,3±9,69 | 60,8±11,26 |
| Moda | 61 | 56 |
| Máximo | 84 | 87 |
| Mínimo | 41 | 36 |
| Relação H/M | 2,92 | |

A população é maioritariamente masculina 156 (63,15%), com os indivíduos nesta subpopulação com idades superiores à subpopulação das mulheres. A subpopulação dos homens apresenta uma média de idades cerca de três anos superior, com prevalência dos indivíduos com 78 anos enquanto que o grupo das mulheres apresenta uma prevalência para uma idade 20 anos inferior. A razão (homem/mulher) encontrada revela uma prevalência dos homens de 1,7 vezes superior relativamente às mulheres (Tabela 2.1). Numa avaliação global, a população controlo é constituída por indivíduos que apresentam uma prevalência para o intervalo etário entre os 71 a 80 anos (32,5%) e uma percentagem de 21,7% para a faixa etária com idades superiores aos 81 anos (Tabela 2.2).

Analisando a sua proveniência geográfica, 55,5% são originários do “Baixo Mondego”, 30,9% do “Pinhal Interior Norte” e 3,8% do “Baixo Vouga”. Uma avaliação ao nível dos distritos identifica o distrito de Coimbra como prevalente, 73,8%, seguindo-se por ordem decrescente os distritos de Viseu, 13,3%, e Aveiro, 3,8% (Tabela 2.2).

Ao nível profissional, os indivíduos foram avaliados relativamente à exposição ocupacional segundo classificação da International Agency for Research on Cancer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS) [IARC Monograph, 2013]. A população foi classificada na variável “profissão de risco” tendo em consideração se a sua actividade profissional envolvia a exposição a agentes comprovadamente cancerígenos, nomeadamente agricultores, trabalhadores da construção civil e indústrias químicas, metalúrgicas e de amianto. Esta classificação está de acordo com as profissões ditas de risco segundo a Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho. A maioria dos indivíduos (51,8%) não apresentou história de exposição ocupacional (Tabela 2.2).

Dos indivíduos com hábitos tabágicos (N=97), 70 (72,2%) eram ex-fumadores e 27 (27,8%) eram fumadores, com uma prevalência de 48 (50,0%) indivíduos com carga tabágica para valores entre 20 uma a 50 uma e 39 (40,6%) indivíduos para valores de carga tabágica superior a 50 unidades maço ano (uma). Ainda dentro deste grupo com hábitos tabágicos, 46 (42,2%) deixou de fumar entre um ano a quinze anos à data do diagnóstico e 32 (29,4%) há mais de quinze anos (Tabela 3.1, pag71). A maioria dos

indivíduos desta população, 148 (60,4%), era não fumadora sendo que na subpopulação feminina 80 (87,9%) pertenciam a esta categoria (Tabela B.1, em Anexo B). Dos 234 inquiridos, 118 (50,4%) eram consumidores de álcool e 116 (49,6%) não consumiam álcool. No grupo dos indivíduos com hábitos tabágicos, 47 (51,1%) indivíduos eram consumidores de álcool em situações para além das refeições ou para valores acima de dois copos à refeição. No grupo dos não fumadores esse valor revelou-se superior, 70 (50,0%) (Tabela B.4, Anexo B).

2.1.2. Amostra da população de doentes

Os indivíduos que constituem a população de doentes, encontravam-se na altura do internamento, 2003 a 2006, no Hospital S. Jerónimo, HUC, para terapia citostática e/ou radioterapia. Esta população é constituída por 200 indivíduos, dos quais 149 (74,5%) são homens, com diagnóstico confirmado para um dos tipos de cancro do pulmão.

Com idades compreendidas entre os 36 a 87 anos e com uma média de idades de 63 anos, esta população apresenta um número significativo de doentes, 64 (32,0%) para o intervalo etário entre 61 a 70 anos. De salientar que para 26 (13,0%) desses indivíduos a neoplasia surgiu antes dos 50 anos e apenas em 7 (3,5%) o diagnóstico foi feito depois dos 80 anos (Tabela 2.2). A subpopulação masculina tem em média 63 anos e uma amplitude amostral que varia entre os 41 anos aos 84 anos. Para este intervalo, a moda é de 61 anos. A subpopulação do sexo feminino, tem uma média de idades de 61 anos, com uma amplitude amostral dos 36 anos aos 87 anos e com uma moda, para esse intervalo, de 56 anos. A razão (homem/ mulher) revela que, nesta população, existem três homens com cancro do pulmão para cada mulher com o mesmo diagnóstico (Tabela 2.1)

A análise da sua proveniência geográfica, revelou que a maioria, 82 (43,2%) era proveniente do “Baixo Mondego”, 31 (16,3%) do “Pinhal Interior Norte” e 20 (10,5%) indivíduos do “Baixo Vouga. Uma avaliação ao nível dos distritos identifica o distrito

de Coimbra como prevalente, 47,5%, seguindo-se por ordem decrescente os distritos de Viseu, 16,5%, e Aveiro, 10,0% (Tabela 2.2).

Relativamente à exposição ocupacional, a maioria dos doentes, 70,4%, não apresentou história de exposição, conforme critérios definidos anteriormente, a quando da caracterização da população controlo.

Dos indivíduos com hábitos tabágicos (N=131), 51 (38,9%) eram ex-fumadores e 80 (61,1%) eram fumadores, com uma prevalência de 70 (55,6%) indivíduos com carga tabágica superior a 50 uma e de 44 (34,9%) indivíduos para valores entre 20 uma a 50 uma (Tabela 3.1, pag. 71). Dentro do grupo de doentes fumadores 75 (93,75%) são homens e 5 (6,25%) são mulheres (Tabela B.1, Anexo B). De salientar, que 79 (69,2%) pertenciam ao grupo dos que nunca deixaram de fumar, deixaram na altura do diagnóstico ou num período inferior a um ano à data do diagnóstico e 22 (19,3%) entre um a quinze anos, tendo como referencia a data do diagnóstico (Tabela 3.1, pag. 71). Dos 182 inquiridos, 120 (65,9%) eram consumidores de álcool e 62 (34,1%) não consumiam álcool. No grupo dos indivíduos com hábitos tabágicos, 95 (82,6%) indivíduos eram consumidores de álcool. Relativamente a indivíduos com familiares em primeiro grau com história de cancro conhecida, 58 (31,2%) dos indivíduos inquiridos revelaram a sua existência, dos quais 40 (29,2) eram do sexo masculino e 40 (32,8%) tinham hábitos tabágicos (Tabela B3, Anexo B).

O diagnóstico destes doentes evidenciou a prevalência de não bilateralidade (83,1%) e da não multifocalidade (81,9%). O tipo histológico prevalente foi o adenocarcinoma, 81 (42,4%), seguido do carcinoma epidermoide, 50 (26,2%) e o carcinoma das células pequenas, 43 (22,5%). A localização do tumor revelou-se prevalente para o lobo superior, 80 (65,0%), para ambos os pulmões. Os indivíduos apresentaram uma prevalência para o estadio IV, 95 (75,4%) e em 76 (39,2%) foram identificadas metástases na altura do diagnóstico. A maioria dos doentes, 190 (98,4%) fez terapêutica citostática e 52 (63,4%) dos indivíduos teve uma sobrevivência inferior a dois anos (Tabela C.1, Anexo C).

Tabela 2.2- Distribuição das características demográficas pelas duas populações estudadas.

| População | Doentes | | Controlo | |
|---|------------------|---------------|-------------------|---------------|
| | Freq.Absoluta(%) | Freq.Acum (%) | Freq. Absoluta(%) | Freq.Acum (%) |
| Género (N=200/240) | | | | |
| Masculino | 149 (74,5) | 74,5 | 153 (63,8) | 63,8 |
| Feminino | 51 (25,5) | 100,0 | 87 (36,3) | 100,0 |
| Intervalos Etários (N= 200/247) | | | | |
| <50 anos | 26 (13,0) | 13,0 | 6 (2,5) | 2,5 |
| [51;60] anos | 57 (28,5) | 41,5 | 44 (18,3) | 20,8 |
| [61;70] anos | 64 (32,0) | 73,5 | 60 (25,0) | 45,8 |
| [71;80] anos | 46 (23,0) | 96,5 | 78 (32,5) | 78,3 |
| >81 anos | 7 (3,5) | 100,0 | 52 (21,7) | 100,0 |
| \bar{x} | 63,06 | | 70,92 | |
| (σ ; amp.amostral) | (10,17; [36-87]) | | (11,24; [40-97]) | |
| NUT (N=190/236) (Unidades Territoriais)* | | | | |
| Baixo Mondego | 82 (43,2) | 43,2 | 131 (55,5) | 55,5 |
| Baixo Vouga | 20 (10,5) | 53,7 | 9 (3,8) | 59,3 |
| Beira Interior Sul | 8 (4,2) | 57,9 | 8 (3,4) | 62,7 |
| Cova da Beira | 2 (1,1) | 58,9 | - | - |
| Pinhal Litoral | 19 (10,0) | 68,9 | 5 (2,1) | 64,8 |
| Dão Lafões | 13 (6,5) | 75,8 | 6 (2,5) | 67,4 |
| Oeste | 1 (0,5) | 76,3 | - | - |
| Pinhal Int. Norte | 31 (16,3) | 92,6 | 73 (30,9) | 98,3 |
| Pinhal Int. Sul | 1 (0,5) | 93,2 | - | - |
| Médio Tejo | 2 (1,1) | 94,2 | 1 (0,4) | 98,7 |
| Serra da Estrela | 11 (5,8) | 100,0 | 3 (1,3) | 100,0 |
| Zona Habitacional (Distritos)(N=200/240) | | | | |
| Coimbra | 95 (47,5) | 47,5 | 177 (73,8) | 73,8 |

| | | | | |
|----------------------------------|-----------|-------|-----------|-------|
| Viseu | 33 (16,5) | 64,0 | 32 (13,3) | 87,1 |
| Aveiro | 20 (10,0) | 74,0 | 9 (3,8) | 90,9 |
| Outros** | 52 (26,0) | 100,0 | 22 (9,1) | 100,0 |
| <hr/> | | | | |
| Profissão de risco(N=162/218) | | | | |
| Sim | 48 (29,6) | 29,6 | 105(48,2) | 48,2) |
| Não | 114(70,4) | 100,0 | 113(51,8) | 100,0 |

* Nomenclatura das Unidades Territoriais para fins estatísticos/** “Outros” compreende os distritos de Castelo Branco, Évora, Braga , Porto e Guarda.

2.2. Métodos

Este estudo envolveu a caracterização ao nível demográfico e genotípico de duas amostras da população portuguesa, caucasiana, da região centro do país. Ao nível demográfico, a sua caracterização teve como base o preenchimento de um inquérito, realizado por um técnico especializado, após explicação do seu objetivo e para o qual os inquiridos deram total consentimento. Nestes dados estatísticos distinguiram-se dois grupos: o grupo das características sócio-demográficas propriamente ditas e o segundo envolvendo as características sócio-demográficas associadas a fatores de risco. Ambas as populações foram caracterizadas ao nível clínico, tendo como base o quadro clínico na altura do diagnóstico.

Procedemos inicialmente à caracterização da população em termos etários, sendo esta, “Idade”, a nossa única variável contínua em todo o estudo. Como tal, recorreremos à estatística descritiva, aplicando o Teste de aderência à normalidade, Kolmogorov-Smirnov, avaliando a sua distribuição e possível desvio da normalidade, coeficientes de Kurtosis (achatamento) e Skweness (simetria) (Anexo A).

A caracterização ao nível demográfico propriamente dito engloba as características que pouco ou nada dependem do indivíduo, são inatas ou consequência de fatores sociais, da região ou do país de referência. Neste grupo estão inseridas o “Género”, “Intervalos etários”, “Zona habitacional-NUT’s” (Nomenclatura das Unidades Territoriais, para fins estatísticos). Fazem parte das características associadas a fatores de risco “Profissão” e “Antecedentes familiares”, “Hábitos tabágicos”, “Tempo de

consumo”, “Abstinência tabágica”, “Carga tabágica” (uma) e “Hábitos etílicos”. As características exclusivamente associadas à doença, e portanto, exclusivas apenas da população de doentes formam o “Quadro clínico”, compreendem a “Localização do tumor”, “Histologia do tumor”, “Bilateralidade”, “Multifocalidade”, “Metastização”, “Estadio”, “Sobrevivência” e “Terapêutica citostática”. Para a população controlo, dentro do mesmo grupo de características (Quadro Clínico), foram abordadas a “Razão do internamento.

Foram estudados 6 genes, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP2D6*, *CYP1A1* (alelos *m1* e *m2*) e *NAT2* em ambas as populações, doentes e controlo. Descritos como envolvidos nas reações de desintoxicação, nomeadamente nas fases I e II das reações de metabolização, surgem desempenhando um papel controverso no processo da carcinogénese, longe da consensualidade. Reconhecendo a complexidade deste processo bem como a acção das enzimas metabolizadoras de drogas (DME - “Drug Metabolizing Enzymes), produtos dos genes acima mencionados, nas reações de desintoxicação, propusemo-nos a averiguar o seu desempenho em duas amostras da população portuguesa, não só com o sentido de determinar a frequência destes genes ao nível da referida população, contribuindo, deste modo, para a informação global ao nível da raça caucasiana para estudos futuros, como também contribuir para a consensualidade relativamente ao seu envolvimento, ou não, no processo da carcinogénese química.

2.3. Caracterização Genotípica da População

A metodologia a seguir descrita foi aplicada para ambas as amostras da população pelo que o texto se limita a referir “população”, subentendendo-se que o tratamento foi comum.

2.3.1. Extração de ADN

A colheita de sangue periférico foi realizada nos serviços dos Hospitais da Universidade de Coimbra, em tubos de 10mL com ácido etilenodiaminotetracético

(EDTA), anti-coagulante, sendo imediatamente congelado a -20°C , para posterior utilização.

As amostras de sangue congelado foram processadas segundo o método descrito por Miller *et al.*, (1988), “método da ureia”.

Após descongelação, as amostras foram lavadas com tampão de lise de eritrócitos, constituído por PBS 1x, contendo 0,1% de IGEPAL. As misturas foram deixadas no agitador, durante 10 minutos, no final do qual se centrifugou a 2500 rpm, durante 20 minutos, numa centrífuga Kubota KN-70. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso, de novo, em PBS/IGEPAL. As lavagens foram repetidas até à obtenção de sobrenadantes límpidos, sem resíduos visíveis de hemoglobina. De seguida, foi adicionado ao “pellet” um tampão de lise constituído por 300mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 e 7 M ureia. Procedeu-se à ressuspensão até homogeneização, no final da qual se adicionou SDS a 10%, num volume correspondente a 1/5 do volume do homogeneizado e deixou-se a incubar durante 8 horas, a 37°C , com agitação constante, 100rpm, num Shaker (Forma Orbital Shaker, Thermo).

As proteínas foram precipitadas por adição de uma solução 6 mM NaCl, na proporção de 1 mL para cada 3,5 mL de amostra. Após agitação vigorosa, procedeu-se à centrifugação, durante 25 min, a 3500 rpm, à temperatura ambiente. Ao sobrenadante recolhido foi adicionado 2,5 vezes o seu volume em etanol absoluto. O ADN assim precipitado foi recolhido e lavado com etanol a 70%. O ADN foi dissolvido em 200 μL de água bidestilada autoclavada e incubado a 65°C , durante 30 minutos, para inactivação das RNases. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

2.3.2. Quantificação do ADN extraído

A quantificação de ADN foi efetuada por espectrofotometria, num espectrofotómetro UV-160 (Shimadzu), através da determinação da absorvância a 260

nm de uma amostra diluída (1:500) de cada solução de ADN. A concentração de ADN final, expressa em ng/ μ L, foi calculada a partir do produto de 500 (factor de diluição) x 50 (constante de concentração para o ADN) x DO (260 nm), tendo em conta que neste comprimento de onda uma solução de ADN de concentração igual a 50 μ g/ mL apresenta uma DO igual a 1. O grau de pureza das soluções de ADN foi determinado atendendo à razão DO(260)/DO(280). Valores desta razão compreendidos entre 1,8 e 2,0 foram indicativos de uma amostra de ADN sem contaminações quer por RNA quer por proteínas. Valores inferiores a 1,8 ou superiores a 2,0 foram indicativos de contaminação com fenol e/ou proteínas e com RNA, respetivamente [Sambrook J. *et al.*, 1989].

2.3.3. PCR

A PCR (“Polimerase Chain Reaction”), a técnica utilizada para a genotipagem da população, foi inicialmente descrita por Karry Mullis, no final da década de 1980.

Esta técnica permite amplificar enzimaticamente pequenos fragmentos do genoma. A reação consiste em repetidos ciclos de incubações, a determinadas temperaturas, onde dois “primers” de oligonucleotídeos hibridam com as cadeias opostas da sequência alvo, ocorrendo a partir deles a extensão do produto de ADN.

Adicionalmente a esta técnica foi, sempre que possível, utilizada a técnica de PCR em tempo real, com os mesmos princípios subjacentes. A monitorização por visualização dos gráficos de amplificação relativos ao aumento de fluorescência versus o número de ciclos proporciona, um meio de avaliar a eficiência de amplificação sob diferentes condições. Assim sendo, o princípio subjacente à técnica de PCR em tempo real pode ser definido como a monitorização do sinal de fluorescência emitido, ciclo após ciclo, por fragmentos de ADN, onde a quantidade de produto amplificado obtido, durante a fase de amplificação exponencial pode ser utilizado para estabelecer a quantidade de material inicial.

2.3.4. Estudo do polimorfismo *GSTP1 Ile¹⁰⁵ Val*

2.3.4.1. PCR-ARMS

O polimorfismo do gene *GSTP1 Ile¹⁰⁵ Val* foi caracterizado recorrendo à técnica de ARMS (Amplification-Refractory Mutation System), inicialmente descrita por Hemmingsen *et al.* (2001) a qual consiste na realização de duas PCR independentes, uma identificando a variante *GSTP1 Ile¹⁰⁵* (c.313A) e a outra a variante *GSTP1 Val¹⁰⁵* (c.313G). Para tal, foi utilizado o mesmo primer proximal e dois primers distais específicos para cada variante. Associada a estas PCR, foi realizada uma segunda PCR na mesma mistura de reação, permitindo a co-amplificação de um segmento da IL18, correspondendo ao controlo interno da amplificação (Tabela 2.3)

Tabela 2.3 - Tabela relativa aos primers utilizados para o estudo do polimorfismo do gene *GSTP1 Ile¹⁰⁵ Val.*, sua sequência e pares de bases (pb) do fragmento resultante.

| Gene | pb | Primers |
|-----------------|-----|--|
| Interleucina 18 | 446 | Proximal: 5' CCA ATA GGA ATG ATT ATT CCG CA 3' |
| | | Distal: 5' AGG AGG GCA AAA TGC ACT GG 3' |
| <i>GSTP 1</i> | 275 | Proximal: 5' GTG TCA GGT GAG CTC TG 3' |
| | | Distal: 5' GGT GTA GAT GAG GGA GAT 3' |
| | | Distal: 5' GGT GTA GAT GAG GGA GAC 3' |

Cada mistura de reação, para um volume de 25 µL, continha cerca de 200 ng de ADN, 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP's, 0,25 µM de mistura de primers, tampão de reação (1X) e 1 unidade de Taq DNA polimerase. Foi utilizado um termociclador "My cycler" da Biorad, sendo a reação de PCR constituída, após uma desnaturação inicial de 10 minutos, a 95 °C, por 35 ciclos com três etapas cada: a primeira etapa relativa à desnaturação da molécula de ADN, ocorre em 30 segundos a 94 °C, a segunda etapa correspondente ao "annealing" dos "primers", em 40 segundos a 58 °C e por fim a

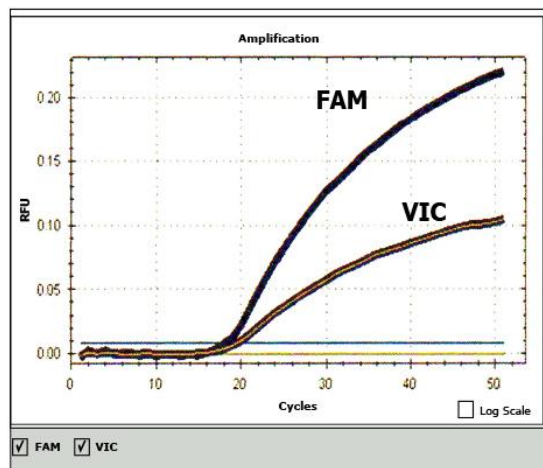
terceira etapa, relativa à extensão dos primers, ocorre em um minuto, a 72 °C. A reação termina com uma extensão a 72 °C, durante cinco minutos.

O produto amplificado foi isolado por electroforese, fazendo correr 7,5 µL de cada amostra com 1,5 µL de Loading Buffer, numa tina de electroforese horizontal, em gel de agarose a 2,5% (p/v) com brometo de etídio (10 mg/mL), em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), com 80 a 90 volts de diferença de potencial e visualizado num transiluminador UV (modelo TM; 220 V; 50 Hz; 90 A; Vilber Lourmat). Para a avaliação e confirmação do peso molecular das bandas obtidas utilizou-se como marcador de peso molecular Φ X 174 RF DNA digerido pela enzima de restrição Hae III (Invitrogen; 0,1 µg/µL).

2.3.4.2. PCR em tempo real

Esta técnica foi utilizada para o estudo do polimorfismo do gene *GSTP1 Ile¹⁰⁵ Val*, em paralelo com a “PCR Arms”, o que permitiu confirmar os resultados obtidos, pela primeira. Foram utilizadas sondas TaqMan, específicas para a sequência que pretendíamos estudar. A principal vantagem da utilização deste tipo de sondas reside no facto delas possuírem elevada especificidade, com uma razão sinal/ruído elevada e capacidade para realizar reações multiplex. Estas sondas possuem, para além da sequência complementar ao fragmento de ADN que pretendemos amplificar, uma molécula que emite fluorescência e que se encontra ligada ao terminal 5', designada por “Reporter”, e uma segunda molécula que inibe a emissão dessa fluorescência, o “Quencher”, ligada ao terminal 3'. Recorrendo da actividade 5' como exonuclease da *Tth* polimerase, durante as etapas de “annealing”/ polimerização, a sonda hibrida com o fragmento de ADN complementar ocorrendo a quebra da ligação do “Reporter”. Esta quebra de ligação faz com que esta molécula se separe da sonda, deixe de estar sob influência do “Quencher” e emita fluorescência. O sinal emitido é proporcional à quantidade de produto amplificado na amostra (Figura 2.1) [Real-time PCR. Applications guide].

A



B

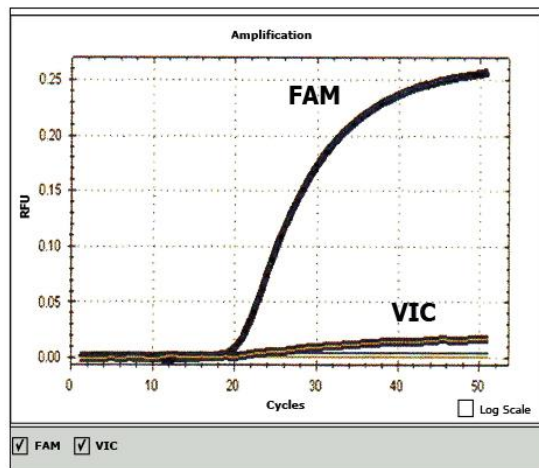


Figura 2.1- Discriminação alélica do *GSTP1*Ile/Val* por PCR em tempo real: na amostra com marcação a verde a fluorescência ocorre na presença da sonda VIC, identificando a homozigotia para o alelo *GSTP¹⁰⁵Ile*, na amostra marcada a azul ocorre fluorescência na presença da sonda FAM, correspondendo a homozigotia para o alelo *GSTP¹⁰⁵Val* (A-heterozigoto *Ile¹⁰⁵Val*; B- homozigoto *Val¹⁰⁵Val*) {[Fonte: Michele Horta, 2010]}.

Para esta análise foi utilizado o kit da Applied Biosystem (TaqManR Genotyping Master Mix), com uma sonda marcada com FAM relativa ao alelo *GSTP1105 Ile* e uma sonda marcada com VIC para o alelo *GSTP1105Val*. A mistura de reação, para um volume final de 10 μ L, continha 200nM de ADN, 1x Master Mix (iQtm supermix, Biorad) e 1X Master Mix (TaqMan^R Applied Biosystems). Após uma desnaturação inicial de 10 minutos, a 95°C, as amostras foram submetidas a 40 ciclos, com duas etapas por ciclo, 15 seg a 92°C e 1 min a 60°C, respectivamente. Foi utilizado um MiniOpticon Mjmin Personal Thermal Cycler Biorad

2.3.4.3. Sequenciação dos produtos amplificados

Com o intuito de confirmar os resultados da diferenciação alélica relativa ao gene *GSTP1 Ile¹⁰⁵Val*, para as duas técnicas acima descritas, procedemos à sua sequenciação automática num sequenciador *AbiPrism 3130 Genetic Analyser*.

A preparação das amostras para sequenciação envolveu três passos: purificação do produto de PCR utilizando um Kit da *Jet Quick PCR Product Purifications Spin Kit / 250 (Genome)*, uma PCR de sequenciação seguida de uma nova purificação, utilizando um kit da *GE Healthcare 1000 Purifications IlustraTM*. A mistura de PCR para sequenciação, com 20µL de volume final, continha 14 µL de água, 2 µL de tampão (*Applied Biosystem*) 2 µL de terminadores (*Applied Biosystem*), 1 µL de ADN e 1 µL de cada primer da sequenciação.

Foram utilizados os mesmos pares de primers para primeira PCR e para a PCR de sequenciação, tendo sido desenhados recorrendo ao programa *Beacon Designer*, *Premier Biosoft International* (Tabela 2.4) A sequência do gene *GSTP1* corresponde ao “access number *NT_167190.1*.

Tabela 2.4- Sequência dos primers utilizados na sequenciação do fragmento amplificado relativo ao gene *GSTP1* (R=Reverse; F= Forward)

| Identificação do Primer | Sequência |
|-------------------------|-------------------------------|
| <i>GSTP1</i> R | 5´ TGT GGC AGT CTC TCA TCC 3` |
| <i>GSTP1</i> F | 5´ GCA GGT TGT GTC TTG TCC 3` |

2.3.5. Estudo do polimorfismo dos genes *GSTT1* e *GSTM1*

O estudo relativo a estes dois genes foi realizado segundo protocolo descrito por *Fatih Okeu et al.*, (2004). A presença ou ausência destes dois genes foi detetada por PCR multiplex, consistindo na sua análise em simultâneo, para uma mesma reação de amplificação. O método permite identificar os indivíduos homocigóticos para a

delecção, *GSTM1**0/*0 ou *GSTT1**0/*0, a qual resulta na ausência de amplificação do segmento específico muito embora ocorra a amplificação do segmento do gene β -globina. No entanto, não permite a distinção entre homozigóticos e heterozigóticos para a presença do gene.

Na mesma mistura de reação foram amplificados três segmentos: um segmento de 215 pb do gene *GSTM1*, um fragmento de 480 pb do gene *GSTT1* e um segmento de 268 pb do gene da β -globina, o controlo positivo da reação (Figura 2.2). As sequências dos primers utilizados são apresentadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5- Genes, sequência dos primers utilizados na PCR Multiplex e tamanho dos fragmentos amplificados (pb)

| Gene | pb | Sequência |
|------------------|-----|--|
| β -globina | 268 | P β -glo F: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' |
| | | P β -glo R: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' |
| <i>GSTM1</i> | 215 | PGSTM1 F: 5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3' |
| | | PGSTM1 R: 5' GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3' |
| <i>GSTT1</i> | 480 | P <i>GSTT1</i> F: 5' TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3' |
| | | P <i>GSTT1</i> R: 5' TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3' |

A amplificação foi realizada num termociclador “My cycler” da Biorad para um volume final de 25 μ l, utilizando-se 200ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 0,25 μ M de primers, DMSO a 5%, tampão da enzima 1x e 1 unidade de Taq DNA polimerase. O programa de PCR envolveu a desnaturação inicial durante 5 min., a 95°C, seguida de 35 ciclos com as seguintes etapas: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C (hibridação dos primers) e 1 minuto a 72°C, para a extensão da polimerização. Adicionalmente, procedemos a uma fase final da extensão, durante 5 minutos, a 72°C.

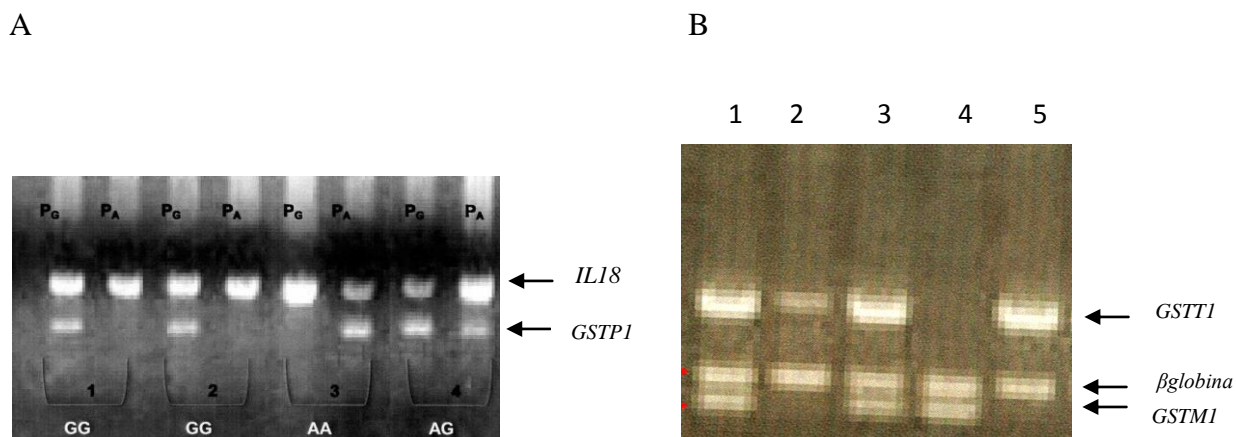


Figura 2.2 - A-Identificação do polimorfismo GSTP1 Ile¹⁰⁵Val por ARMS. Par 1 e par 2 são homozigóticos GG; par 3 indivíduo homozigótico AA e par 4 indivíduo heterozigótico. **Pa**- PCR com primer distal A; **Pg**- PCR com primer distal G. B- Imagem de um gene de agarose permitindo a genotipagem dos genes *GSTM1* e *GSTT1* por PCR Multiplex. 1 e 3 *GSTM1* e *GSTT1* positivos (homozigóticos ou heterozigóticos para a presença dos genes); 2 e 5 *GSTM1* negativos (homozigóticos para a deleção); 4 *GSTT1* negativo (homozigótico para a deleção) [Fonte: Michele Horta, 2010].

2.3.6. Estudo do polimorfismo do gene *CYP2D6*

A técnica utilizada para avaliação deste gene na população foi inicialmente descrita por Gough *et al.*, (1990). Esta, PCR-RFLP (“PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism”) permite identificar e classificar o genótipo para o referido gene, após amplificação e digestão de um fragmento da molécula de DNA com uma enzima de restrição, cujo local de reconhecimento contém o “SNP” (“Single Nucleotide Polymorphism”). Para este gene, o fragmento amplificado possui 334 pb, cujos “primers” utilizados na reação de polimerização em cadeia, para detecção da transição G→A, na junção do intrão 3 com o exão 4 estão identificados no Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Sequência dos “primers” utilizados na identificação do polimorfismo do gene *CYP2D6*.

| Designação do primer | Sequência |
|----------------------|---------------------------------|
| Primer forward | 5´GCT TCG CCA ACC ACT CCG 3´ |
| Primer reverse | 5´AA ATC CTG CTC TTC CGA GGC 3´ |

A reação de PCR envolveu um primeiro passo de desnaturação da molécula de DNA a 96°C, durante 10 minutos, seguindo-se um total de 30 ciclos, em que cada ciclo consistiu em três passos. O primeiro, 1 minuto, a 94°C, o segundo, 30 segundos, a 60°C (hibridação dos “primers”) e o terceiro, 1 minuto, a 72°C (extensão da polimerização). Procedemos a uma fase final da extensão, durante 5 minutos, a 72°C. Para um volume final da mistura de reação de 50 µL por tubo, foram utilizados 60 ng de DNA, Tampão de reação da enzima Taq DNA polimerase 1x, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,25 µM de primers, DMSO a 5% e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Stratagene).

O controlo da amplificação foi realizado por electroforese em gel de agarose. Após confirmação da amplificação do fragmento de 334 pb, procedeu-se à sua digestão com a enzima de restrição BstN1 (BioLabs). Esta enzima reconhece e cliva sequências de 5 pares de bases com a seguinte ordem (Promega).

A

5´ CC/TGG 3´

3´ GGA/CC 5´

T

Esta capacidade enzimática permite identificar três genótipos possíveis para a transição estudada. A 20 µL de cada mistura de reação de PCR, foram adicionados 1/10

do volume total de tampão de restrição (1xNEBuffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT,(pH7,9), 100 µg/mL BSA) (BioLabs), 1 U de BstN I e dH₂O até um volume final de 30 µL.

As misturas de digestão foram incubadas durante a noite, num banho termostático, à temperatura de 60°C. A enzima de restrição BstN1 digere o fragmento amplificado em dois fragmentos de 230pb e de 104 pb.

A visualização dos fragmentos após digestão foi feita através da realização de uma eletroforese em tina vertical (Vertical Slab Gel Unit-Model SE400, Hoefer Scientific Instruments), em gel de acrilamida a 5%, em tampão TBE (10x: 0,89 M Tris-borato, 0,02 M EDTA, pH 8,0). O gel de acrilamida foi preparado adicionando-se 8,3 mL de 30% acrilamida (acrilamida-bisacrilamida, 29:1) a 35,65 mL de dH₂O e 5 mL de 10x TBE. Por fim, foi adicionada a esta mistura 1,05 mL de 10% APS e 17,5 µL de TEMED.

Como marcador molecular foi utilizado Φ X 174 RF DNA digerido pela enzima de restrição Hae III (Invitrogen; 0,1 µg/µL). Em cada poço foi colocada uma mistura de digestão com 6 µL de “loading buffer IV”. A eletroforese foi deixada a correr a ~120V, durante cerca de 2 horas, até a frente de migração, constituída pelas bandas de “loading buffer IV”, terem atingido 3/4 do gel. Para visualização das bandas de DNA, o gel foi corado com uma solução de (0,5 µg/mL) de brometo de etídio em tampão 1X TBE, durante cerca de 30 minutos. As bandas foram visualizadas num transiluminador de UV (Transiluminador UUB, modelo TM; 220V; 50 Hz; 90 A; Vilber Lourmat) e os géis fotografados utilizando uma câmara Polaroid para registo e análise (Figura 2.3).

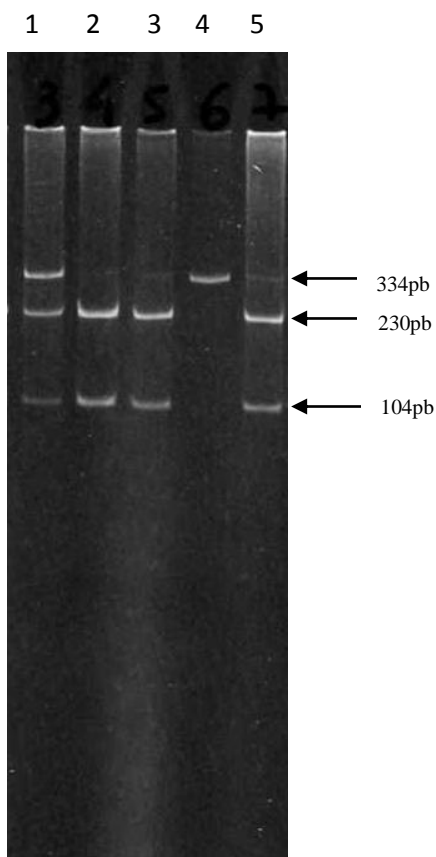


Figura 2.3- Gel de acrilamida após digestão do fragmento de 334 pb de *CYP2D6* com a enzima de restrição BstN1: 1- indivíduo heterozigótico (G/A); 2,3,5-indivíduos homozigóticos (G/G); 4- indivíduo homozigótico para alelo raro (A/A)

2.3.7. Estudo do polimorfismo do gene *CYP1A1* (alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*)

Os polimorfismos do gene *CYP1A1* relativos aos alelos *CYP1A1*2A* (transição T6235C) e *CYP1A1*2C* (transição A4889G) foram analisados por PCR RFLP, segundo técnicas descritas por Nakachi *et al.* (1991) e Hayashi *et al.* (1991), respetivamente.

Para o polimorfismo do alelo *CYP1A1*2A*, a reação de PCR envolveu um primeiro passo de desnaturação da molécula de DNA a 94°C, durante 5 minutos, seguindo-se um total de 30 ciclos, em que cada ciclo consistiu em três passos. O primeiro, 30 segundos, a 94°C, o segundo, 1 minuto, a 62°C (hibridação dos “primers”) e o terceiro, 1 minuto, a 72°C (extensão da polimerização). Procedemos a uma fase final da extensão, durante 5 minutos, a 72°C. Para um volume final da mistura de reação de

50 µL por tubo, foram utilizados 200 ng de DNA, Tampão de reação da enzima Taq DNA polimerase 1x, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,20 µM de “primers”, DMSO a 5% e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Bioline) (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 - Sequência dos “primers” utilizados na identificação do polimorfismo do gene *CYP1A1*, alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*.

| Alelo | Primer | Sequência |
|------------------|----------------|-----------------------------------|
| <i>CYP1A1*2A</i> | Primer forward | 5' TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT 3' |
| | Primer reverse | 5' CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT 3' |
| <i>CYP1A1*2C</i> | Primer forward | 5' CAG ACC AGG TAG ACA GAG 3' |
| | Primer reverse | 5' GTC CAC CCT CTT AAG CTC T 3' |

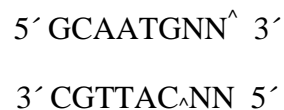
Os produtos PCR foram visualizados num transiluminador UV após eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio. Após confirmação dos fragmentos (340 pb) amplificados procedeu-se à digestão dos mesmos através da enzima de restrição MspI (Amersham) que, na presença do polimorfismo T6235C digere o fragmento amplificado em dois fragmentos de 200pb e de 140 pb. A forma T6235 corresponde à ausência de local de restrição. Esta enzima reconhece e cliva sequências de 4 pares de bases com a seguinte ordem [Amersham Bio]:

5'CCGG3'

3'GGCC5'

A mistura de digestão, volume total 15 µL, contendo 5 µL do produto de PCR, tampão de enzima 1X, 3 U MspI, foi deixada durante a noite a 37°C. Os fragmentos digeridos foram visualizados após fazer correr as misturas de digestão numa tina de eletroforese vertical, em gel de acrilamida e tampão TBE 1X, posteriormente corado com brometo de etídio.

Para identificação do polimorfismo do alelo *CYP1A1*2C* foi utilizado um volume de mistura de reação, para PCR, de 50 µL constituída por 200ng de DNA, tampão de reação da enzima Taq DNA polimerase 1x, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,20 µM de “primers”, DMSO a 5% e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Bioline). A reação de PCR foi idêntica à descrita para o alelo *CYP1A1*2A*, com a única variante relativa à temperatura de “annealling” dos primers, cujo valor para o alelo *CYP1A1*2C* foi de 61°C. Os produtos PCR foram visualizados num transiluminador UV após eletroforese em gel de agarose a 1%, com brometo de etídio. Após confirmação da amplificação do fragmento (350 pb), este foi digerido com a enzima de restrição *BsrDI* (GibcoBRL), com a seguinte sequência de restrição [GibcoBRL]:



A mistura de digestão continha, para um volume final de 15 µL, 5 µL de produto PCR, tampão de enzima 1X e 4U de *BsrDI*. Foi deixado a digerir durante a noite a 65°C. A enzima de restrição *BsrDI*, digere o fragmento de 350 pb em dois de 232 pb e 128 pb. A forma A4889 corresponde ao local de restrição da enzima *BsrDI* (Figura 2.4).

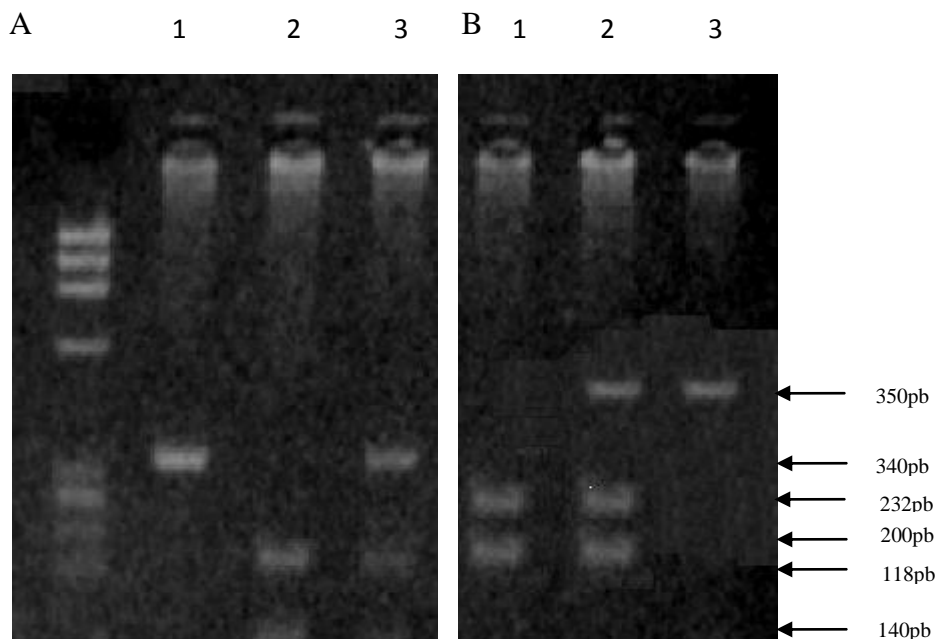


Figura 2.4 - Gel de acrilamida após digestão dos fragmentos amplificados de *CYP1A1* com as enzimas de restrição *MspI* e *BsrDI*, permitindo identificar os alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A*2C*. A- Padrão de digestão para *CYP1A1*2A*: 1-homozigótico (T/T); 2-homozigótico (C/C) (alelo raro); 3-heterozigótico (T/C) / B- Padrão de digestão para *CYP1A1*2C*: 1- homozigótico (A/A); 2- heterozigótico (A/G); 3- homozigótico (G/G) (alelo raro) (Fonte: Mota *et al.*, 2010).

2.3.8. Estudo dos polimorfismos do gene *NAT2*

A análise dos polimorfismos do gene *NAT2* foi realizada segundo o método descrito por Smith *et al.*, (1997), utilizando a técnica de PCR RFLP.

Foi realizada uma reação de PCR para amplificar um fragmento de 547 pb, o qual contém os locais de restrição de 4 enzimas distintas, com as quais é possível reconhecer as mutações (SNP) nas posições C481T, A803G, G590A e G857A. O bandejamento eletroforético produzido após digestão individual com as enzimas de

restrição KpnI, Dde I, Taq I e BamHI permitiu avaliar e classificar o genoma das populações estudadas (Tabelas 2.8 e 2.9).

A mistura para a reação de PCR, com um volume de 100 μ L por cada amostra de DNA, continha 200 ng DNA, tampão da enzima Taq DNA polimerase 1X(15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8,4), 200 μ M de dNTPs, 0,25 μ M de “primers”, DMSO a 5% e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Bioline). A reação de PCR envolveu um primeiro passo de desnaturação da molécula de DNA a 94°C, durante 5 minutos, seguindo-se um total de 35 ciclos, cada ciclo consistindo em três passos, o primeiro, 30 segundos, a 94°C, o segundo, 1 minuto, a 62°C (hibridação dos “primers”) e o terceiro, 1 minuto, a 72°C (extensão da polimerização). Procedemos a uma fase final da extensão, durante 5 minutos, a 72°C. Após amplificação, esta foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (descrito em “Material e métodos-2.3.6.”).

Tabela 2.8 - Sequência dos “primers” utilizados na identificação dos polimorfismos do gene *NAT2*.

| Designação do primer | Sequência |
|---|-------------------------------------|
| Primer forward (entre 367 e 386 nucleotídeos) | 5' GCT GGG TCT GGA AGCTCC TC 3' |
| Primer reverse (entre 892 e 913 nucleotídeos) | 5' TTG GGT GAT ACA TAC ACA AGG G 3' |

Após confirmação da amplificação, foram retirados 20 μ L aos quais foram adicionados tampão de reação da enzima e 3 U de enzima, para um volume final de 25 μ L. A mistura foi submetida a digestão durante a noite, num banho termostático a 65°C para a enzima de restrição Taq I e a 37°C para as restantes enzimas.

Tabela 2.9 - Caracterização das enzimas utilizadas no estudo dos polimorfismos do gene *NAT2*.

| Enzima de restrição | Local de reconhecimento | SNP | Alelos identificados |
|---------------------|------------------------------|-------|----------------------|
| KpnI (Invitrogene) | 5'GGTAC C 3' 3' CATGG 5' | C481T | *4/*5A/*5B |
| TaqI (Invitrogene) | 5' CGA 3' 3'AGC T 5' | G590A | *4/*6 |
| DdeI (Invitrogene) | 5' TNAG 3' 3'GANT C 5' | A803G | *4/*5A/*5C |
| BamHI (Amersham) | 5'G GATCC 3' 3'CCTAG G 5' | G857A | *4/*7 |

A visualização dos fragmentos digeridos foi realizada em tina de eletroferese vertical, em gel de acrilamida 8% e tampão TBE 1X, de acordo com método já descrito em “Material e métodos 2.3.6” (Figura 2.5).

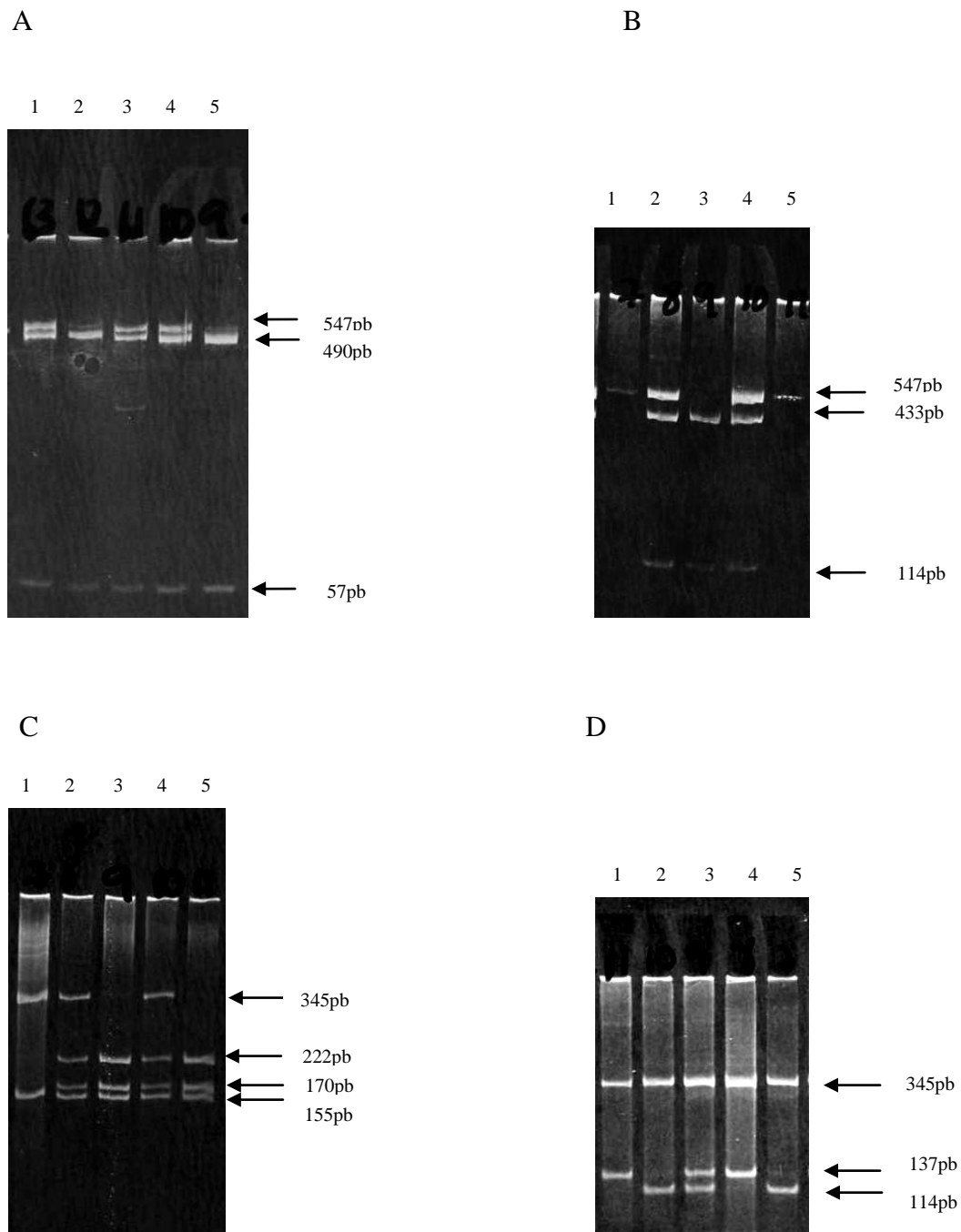


Figura 2.5. Padrão de digestão do gene *NAT2*, após digestão com as enzimas de restrição Bam H1 (A), Kpn1 (B), Taq1 (C) e Dde1 (D). A-Digestão com BamH1, identifica G857A: 1, 3, 4- indivíduos heterozigóticos (G/A); 2, 5- indivíduos homozigóticos (G/G); B- Digestão com Kpn1, identifica C481T: 1,5- indivíduos homozigóticos (T/T), 2,4- indivíduos heterozigóticos (C/T), 3-indivíduos homozigóticos (C/C); C- Digestão com Taq1, identifica G590A: 1 indivíduo homozigótico (A/A), 2,4- indivíduos heterozigóticos (G/A), 3,5-indivíduos homozigóticos (G/G); D- Digestão com Dde1, identifica A803G:1,4- indivíduos homozigóticos (A/A); 3 indivíduo heterozigótico (A/G); 2, 5- indivíduos homozigóticos (G/G).

2.4. Análise histoquímica do gene supressor tumoral TP53

O estudo imunohistoquímico foi realizado em amostras de tecido parafinado proveniente de biopsias ou de peças cirúrgicas. A coloração imunohistoquímica foi realizada com Bond Polymer Refine Detection™ (DS9800; Leica Biosystems, Newcastle Ltd, United Kingdom) de acordo com as instruções do fabricante em BondMax. Inicialmente, foram aplicados às amostras os anticorpos para TP53 (clone DO-7; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) numa diluição de 1:100 e o anticorpo TP53 Ab-1 (clone Pab 240; Thermo Scientific, Fremont, CA) numa diluição de 4µg/mL, ambos durante 30 minutos, à temperatura ambiente [Mogi A. *et al.*, 2011]. Paralelamente, foram utilizados controlos positivos e negativos da reação. A intensidade da coloração foi classificada de modo semi-quantitativo numa escala de quatro (0, 1+, 2+, 3+) considerando 1-positividade focal; 2-positividade média; 3- positividade moderada, 4- positividade intensa. A percentagem de células coradas foi também registada. O resultado final foi obtido multiplicando a intensidade pela percentagem de células com expressão imunohistoquímica e o valor considerado significativo foi de 10% de células positivas por lâmina (Figura 2.6).

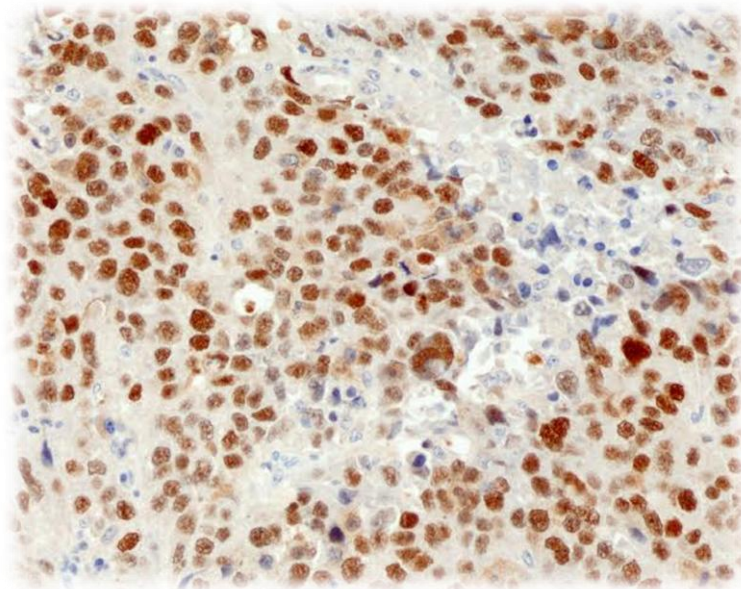


Figura 2.6 - Coloração por imunohistoquímica, com TP53 Ab-1 positivo (200x), de um carcinoma pleomórfico.

2.5. Análise Estatística

O inquérito realizado às duas amostras da população foi construído numa reunião da equipa médica do Serviço de Pneumologia, dos HUC, com base na sua experiência clínica e em estudos prévios realizados no laboratório da Unidade de Genética Médica e publicados em anteriores trabalhos [Mota, P,*et al* 1995]. O questionário abrange alguns itens sobre dados demográficos, sócio-económicos, hábitos tabágicos, razões do internamento, caracterização do tipo de cancro diagnosticado, entre outras, permitindo desta forma obter a maior informação possível sobre as amostras analisadas.

O estudo estatístico foi realizado com apoio informático utilizando o programa IBM-SPSS, versão 20 (Windows 2003).

Foi avaliada a distribuição da população, na globalidade e por grupos, para a variável idades recorrendo ao teste paramétrico de aderência à normalidade Kolmogorov-Smirnov, com a correcção de Lilliefors [Pestana e Gageiro, 2008].

Foram aplicados testes não paramétricos em variáveis categoriais, para amostras independentes, nomeadamente o teste da Binomial, o teste de aderência ao Qui-Quadrado e o teste do “rácio dos produtos cruzados” (OR).

O teste da Binomial foi aplicado em variáveis dicotómicas, para testar a equipartição das categorias dessas mesmas variáveis. Em variáveis categorizadas foi aplicado o teste de aderência do Qui-Quadrado ou como extensão do teste da Binomial. Este teste compara as frequências esperadas com as que se esperariam obter no universo de estudo, não sendo aplicável quando existe alguma célula com frequência esperada inferior a 1 ou quando mais do que 20% das células possuem frequências esperadas inferiores a 5.

Para avaliar a associação entre as variáveis procedemos à aplicação do teste de independência do Qui-Quadrado. A negação da hipótese nula, valores de Sig. inferiores a 0,05, permite assumir uma associação entre as variáveis analisadas, ou seja, negar a sua independência. Eventualmente, em tabelas de dupla entrada (2x2), quando as frequências esperadas de uma ou mais células foram inferiores a 5, recorreu-se ao teste exato de Fisher ou o teste de Monte Carlo, por análise iterativa. O teste OR, mede a

associação entre duas variáveis nominais, em que uma das variáveis, designada por factor, é de ocorrência anterior à outra, designada por acontecimento [Pestana e Gageiro, 2008]. Este foi aplicado sempre que, em tabelas de dupla entrada (2x2), a associação revelou-se estatisticamente significativa (Sig. <0,05).

Para determinar este grau de associação entre as variáveis, procedemos à aplicação da análise por regressão logística.

Por concatenação, determinamos qual a combinação ou sequências de genótipos, dos diversos genes estudados, prevalentes nas populações ou subpopulações e dentro de cada característica estudada. Os genes ou alelos concatenados foram avaliados para as características cuja associação com os genótipos se revelou estatisticamente significativa..

Para avaliar a contribuição de cada característica para o “perfil do doente com cancro do pulmão”, procedemos à aplicação da análise por regressão logística. Esta permitiu definir quais as variáveis que possivelmente estão envolvidas na definição do referido perfil.

Capítulo III

RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Caracterização da população doente e da população controlo

O presente estudo foi realizado em contexto hospitalar, no Serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, em portugueses caucasianos, divididos em dois grupos: população de doentes (N=200), com diagnóstico de cancro do pulmão e população controlo (N=247), sem diagnóstico de cancro do pulmão, embora estivessem a receber tratamento no mesmo departamento hospitalar devido a outras doenças do foro respiratório.

Na impossibilidade de a equipa de investigação conseguir obter uma amostra controlo populacional aleatória, foi escolhida uma amostra controlo hospitalar, reconhecendo-se, contudo, a eventualidade de ocorrência de um enviesamento de Berkson ou hospitalar.

Foram avaliadas características demográficas, como sejam a idade e o sexo e características demográficas associadas a fatores de risco, tais como a existência de profissão de risco, hábitos tabágicos, carga tabágica, cessação tabágica, consumo de álcool e antecedentes familiares (Tabela 3.1). Quando avaliadas as distribuições das populações nas diferentes categorias das variáveis demográficas ou de risco, as percentagens consideradas remetem para a população analisada enquanto que quando analisadas as variáveis clínicas as percentagens apresentadas dizem respeito à distribuição da população pelas categorias da referida variável.

No presente estudo, a característica idade foi agrupada em intervalos etários com amplitude de 10 anos, com exceção para os intervalos correspondentes aos extremos da variável contínua aos quais corresponde uma amplitude de 11 anos. A metodologia aplicada teve em consideração o estudo realizado com a variável contínua idade, a qual revelou uma prevalência da população de doentes para faixas etárias abaixo dos 66 anos, (n=119; 59,5%), enquanto que para a população controlo, a prevalência ocorreu acima dos 67 anos (n=161; 65,2%) (Pop. doentes (média± desvio padrão):

63,06±10,170 anos; Pop. Controlo (média± desvio padrão): 70,92±11,24 anos;tabela A.4, Anexo A) (Tabela 3.1). Uma maior estratificação da população implicaria a inclusão de um número reduzido de indivíduos por intervalo, condicionando a aplicação dos testes estatísticos não paramétricos, nomeadamente o χ^2 . A distribuição etária adoptada revela uma associação estatisticamente significativa entre a população de doentes e os intervalos etários ($\chi^2= 56,623$; Sig<0,001).

As características sexo, profissão de risco, história familiar, hábitos tabágicos, cessação tabágica e hábitos alcoólicos revelaram-se estatisticamente significativas para a caracterização das populações, evidenciando uma associação entre estas e a população de doentes (sexo: $\chi^2 = 6,559$; Sig= 0,010; profissão de risco: $\chi^2 = 13,275$; Sig<0,001, história familiar: $\chi^2 = 39,05$; Sig<0,001; hábitos tabágicos: $\chi^2 = 29,582$; Sig<0,001; cessação tabágica: $\chi^2 = 30,635$; Sig<0,001; consumo de álcool: $\chi^2 = 10,056$; Sig=0,002, Tabela 3.1). Por avaliação do odds ratio (OR), verificou-se que os indivíduos da população de doentes, quando do sexo masculino, possuem um risco 1,7 vezes superior, relativamente aos do sexo feminino. Relativamente à profissão de risco, a população controlo revelou ter um maior número de indivíduos com profissões consideradas de risco pela “Internacional Agency for Research on Cancer” (IARC), sendo associadas a esta população um risco 2,21 vezes superior. Por outro lado, a presença de familiares em primeiro grau com alguma forma de cancro parece conferir um aumento de suscetibilidade para o desenvolvimento de neoplasia pulmonar de 5,34 vezes. O período cessação tabágica, os hábitos tabágicos e o consumo elevado de álcool, fora das refeições revelaram-se fatores importantes neste estudo de associação. As duas últimas características conferem, respetivamente, um risco aumentado de 2,897 e 1,903 vezes para esta doença (Tabela 3.1).

Por estratificação da população relativamente aos hábitos tabágicos, no grupo dos fumadores, o consumo de álcool confere um aumento do risco de 4,5 vezes, enquanto que no grupo dos não fumadores esta mesma associação não é significativa (Subpopulação com hábitos tabágicos e hábitos alcoólicos: $\chi^2 = 23,576$; Sig<0,001;Subpopulação sem hábitos tabágicos e com hábitos alcoólicos: $\chi^2 = 4,937$; Sig=0,087).

Ainda relativamente aos hábitos tabágicos, o teste χ^2 não revelou uma associação estatisticamente significativa entre a carga tabágica e a população de doentes ($\chi^2 = 5,616$; Sig=0,123) bem como entre esta e o tempo de consumo ($\chi^2 = 1,022$; Sig=0,796).

Foi realizado um estudo, estratificando a população em função da carga tabágica, pretendendo avaliar o comportamento das duas populações, relativamente à intensidade do consumo. Ambas as populações possuem um comportamento semelhante quando considerado o tempo de consumo para cada categoria da variável carga tabágica (<5 uma: χ^2 (T. Exato Fisher)= 0,467, Sig= 1,00/ [5,20[uma: χ^2 (T. Exato Fisher)= 0,774, Sig= 0,679/ [20;50[uma: χ^2 (T. Exato Fisher)= 0,213, Sig= 0,899/ >50 uma: χ^2 (T. Exato Fisher)= 1,566, Sig= 0,457).

A aplicação do teste de aderência do χ^2 , por forma a avaliar a uniformidade da distribuição da população de doentes pelas categorias das variáveis carga tabágica e tempo de consumo, relativamente à distribuição encontrada para a população controlo, permitiu confirmar a uniformidade das distribuições entre as duas populações (Carga tabágica: $\chi^2 = 13,028$; sig=0,054; Tempo de consumo: $\chi^2 = 2,265$; sig=0,519). Foi ainda realizado outro estudo para avaliar a distribuição da carga tabágica pelos diferentes intervalos etários e foram comparados os resultados entre as duas populações por aplicação do teste de χ^2 . Os valores de χ^2 encontrados para cada estrato etário confirmou a ausência de associação ente esta característica e a população de doentes ([36; 56[anos: $\chi^2 = 3,26$, Sig= 0,353/ [57;66[anos: $\chi^2 = 5,172$, Sig= 0,160/ [67;76[anos: $\chi^2 = 4,723$, Sig= 0,193/ [77; 97] anos: $\chi^2 = 2,765$, Sig= 0,429).

Tabela 3.1 Avaliação das características associadas a fatores de risco nas duas populações, doente e controlo.

| Caraterísticas | | Doentes | Controlo | χ^2 (sig) | Odds Ratio [IC] |
|----------------------------------|---|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| | | Numero de casos (%) | Numero de casos (%) | | |
| Intervalos Etários (anos) | | | | | |
| | [36;56[| 54 (27,0) | 26 (10,5) | 56,623 (<0,001) | - |
| | [57;66[| 65 (32,5) | 60 (24,3) | | |
| | [67;76[| 68(34,0) | 79 (32,0) | | |
| | [77;97[| 13 (6,5) | 82 (33,2) | | |
| | $\bar{x}\pm\sigma$; AA (Ampl. Amostral) | 63,06 \pm 10,17 [36;87] | 70,92 \pm 11,24 [40;97] | | |
| Sexo | | | | | |
| | Masculino | 149 (74,5) | 156 (63,2) | 6,559 | 1,704 |
| | Feminino | 51(25,5) | 91 (36,8) | (0,010) | [1,13;5,67] |
| Profissão de risco | | | | | |
| | Sem risco | 114 (70,4) | 113 (51,8) | 13,275 | 2,21 |
| | Com risco | 48 (29,6) | 105 (48,2) | (<0,001) | [1,44;3,39] |
| História Familiar | | | | | |
| | Sim | 58 (31,2) | 19 (7,2) | 39,05 | 5,34 |
| | Não | 128 (68,8) | 224(92,2) | (<0,001) | [3,05;9,37] |
| Hábitos Tabágicos | | | | | |
| | Sim | 131(65,5) | 97(39,6) | 29,582 | 2,897 |
| | Não | 69(34,5) | 148(60,4) | (< 0,001) | [1,97;4,27] |
| Carga Tabágica | | | | | |
| | <5 uma | 5 (4,0) | 3 (3,2) | 5,616 (0,123) | - |
| | [5;20[uma | 7 (5,5) | 6 (6,2) | | |
| | [20;50[uma | 44 (34,9) | 48 (50,0) | | |
| | >50 uma | 70 (55,6) | 39 (40,6) | | |
| Tempo de consumo | | | | | |
| | <30anos | 29(23,4) | 19(20,7) | 1,022 (0,796) | - |
| | [30;40[| 39(31,5) | 26(28,3) | | |
| | [40;50[| 35(28,2) | 27(29,3) | | |
| | >50anos | 21(16,9) | 20(21,7) | | |
| Cessaçao Tabágica | | | | | |
| | <1 ano | 79 (69,3) | 31 (28,4) | 30,635 | - |
| | [1;15] | 22 (19,3) | 46 (42,2) | (<0,001) | |
| | >15 anos | 13 (11,4) | 32 (29,4) | | |
| Hábitos alcoólicos | | | | | |
| | Sim | 120 (65,9) | 118 (50,4) | 10,056 | 1.903 |
| | Não | 62 (34,1) | 116 (49,6) | (0,002) | [1,21;2,84] |
| Fumadores | | | | | |
| Consumo de Alcool | Sim | 95 (82,6) | 47 (51,1) | 23,576 | 4.5 |
| | Não | 20 (17,4) | 45 (48,9) | (<0,001) | [2,42;8,56] |
| Não Fumadores | | | | | |
| Consumo de Alcool | Sim | 25 (37,3) | 70 (50,0) | 4,937 | - |
| | Não | 42 (62,7) | 70 (50,0) | (0,087) | |

A regressão logística foi aplicada para determinar quais as variáveis que mais contribuem para “ser doente” e qual a contribuição de cada uma para o diagnóstico de cancro do pulmão (Tabela 3.2). O modelo é constituído por quatro variáveis independentes, o sexo, a história familiar, o consumo de álcool e a cessação tabágica. Como modelo integral, contendo todas as variáveis preditoras, possui significância estatística ($\chi^2= 30,166$, Sig<0,001), evidenciando a sua capacidade em distinguir entre variável de “risco” e variável de “não risco”. A variável sexo revelou-se estatisticamente significativa (Sig=0,041), verificando-se que ser do sexo masculino confere um risco aumentado de 3,80. Outro fator de risco é a história familiar. Possuir familiares em primeiro grau com cancro contribui para “ser doente” (Sig<0,001), com um fator de risco doze vezes superior. O consumo de álcool confere um aumento do risco de 3,153 (Sig= 0,003). O último fator preditor, a variável período de cessação tabágica, é um fator que integralmente contribui para a suscetibilidade para a doença (Sig< 0,001). Relativamente às categorias desta variável, a cessação num período inferior a um ano, relativamente à altura do diagnóstico, revela um risco 10,553 superior comparativamente com o período de cessação superior a quinze anos. A cessação entre um a quinze anos antes do diagnóstico, não apresenta risco relativamente ao período superior a quinze anos (Sig= 0,162).

Tabela 3.2 Regressão logística relativa à contribuição das variáveis de risco para o diagnóstico do cancro do pulmão

| Caraterísticas | B | SE | Wald | df | Sig | Exp(B) | IC (95%) |
|-------------------------|--------|-------|--------|----|-------|--------|--------------|
| Sexo(masc.) | 1,334 | 0,654 | 4,161 | 1 | 0,041 | 3,80 | [1,05;13,69] |
| His.famil.(sim) | 2,502 | 0,594 | 17,730 | 1 | 0,000 | 12,21 | [3,81;39,14] |
| Háb. Álcool. (sim) | 1,148 | 0,386 | 8,866 | 1 | 0,003 | 3,153 | [1,48;6,71] |
| Cessaçã Tab. (>15 anos) | | | 26,854 | 2 | 0,000 | | |
| <1 ano | 2,356 | 0,517 | 20,745 | 1 | 0,000 | 10,553 | [3,83,29,09] |
| [1;15] | 0,750 | 0,536 | 1,954 | 1 | 0,162 | | |
| Constante | -3,597 | 0,811 | 19,672 | 1 | 0,000 | 0,027 | |

3.2. Estudo dos polimorfismos das enzimas das fases I e II.

Foram determinadas as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos (SNP) dos genes responsáveis por algumas das enzimas das fases I e II do metabolismo, respetivamente *CYP1A1*2A* (3798T>C, rs4646903), *CYP1A1*2C* (2454A>G, rs1048943) e *CYP2D6*4* (1846G>A, rs3892097) bem como *GSTP1* (Ile105Val, NM_000852.3), *GSTT1* (NM_000853), *GSTM1* (NM_000561) e alguns polimorfismos mais frequentes do gene *NAT2*, responsáveis pelos fenótipos “metabolizador lento” e “metabolizador rápido” (481C>T, rs1799929; 590G>A, rs1799930; 857G>A, rs1799931; 803A>G, rs1208).

A Tabela 3.3 diz respeito à distribuição das frequências genóticas encontradas para os polimorfismos mencionados nas duas populações e após estratificação das duas populações, em função do sexo. A distribuição das frequências genóticas dos polimorfismos estudados para o gene *CYP1A1*, *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* não evidenciou associações estatisticamente significativas com a população de doentes com cancro do pulmão, nem mesmo após estratificação (*CYP1A1*2A*: Sig(doentes/controlo) = 0,277; Sig_{homens}(doentes/controlo) = 0,460; Sig_{mulheres}(doentes/controlo) = 0,537; *CYP1A1*2C*: Sig(doentes/controlo) = 0,455; Sig_{homens}(doentes/controlo) = 0,261; Sig_{mulheres}(doentes/controlo) = 0,927). Relativamente a *CYP2D6*4*, existe uma associação estatisticamente significativa entre a distribuição genotípica encontrada e a população de doentes do sexo feminino ($\chi^2=8,206$; Sig=0,017). Os valores dos resíduos ajustados permitiram identificar as formas heterozigóticas (G/A) e mutadas (A/A) como as que mais contribuem para o valor encontrado para este teste.

Após estratificação, o gene *GSTP1* apresenta, na forma homozigótica (G/G), prevalência na população de doentes do sexo feminino (*GSTP1*: Doentes=27,5%/Controlo=8,6%), revelando uma associação estatisticamente significativa ($\chi^2=8,296$, Sig=0,016). O gene *GSTT1* apresenta uma distribuição estatisticamente significativa entre as duas populações ($\chi^2=4,09$, Sig=0,030), com um risco 1,6 superior para a população de doentes portadores do genótipo classificado como ausente (-) relativamente ao genótipo classificado como “presente” (+). Após

estratificação, manteve-se a associação estatisticamente significativa para a população masculina ($\chi^2=5,123$, Sig=0,024), sendo o risco superior de 1,84, para indivíduos do sexo masculino portadores do genótipo ausente. A deleção do gene *GSTM1*, definida como “ausente”, não apresenta uma associação estatisticamente significativa, quer quando avaliada entre populações, quer após estratificação das populações pelo sexo.

A distribuição das frequências genótípicas do gene *NAT2* presente nas duas populações e agrupadas em função do seu fenótipo, encontram-se descritas na Tabela 3.4. Relativamente ao fenótipo “acetilador rápido” verifica-se a prevalência dos genótipos 4/4 e 4/6 na população controlo, com as respetivas frequências 6,1% e 7,0%. O fenótipo “acetilador lento” apresenta dois genótipos prevalentes na população de doentes relativamente à população controlo, o genótipo 5B/7 (população de doentes: 50,3%; população controlo: 39,4%) e o genótipo 6/7 (população de doentes: 6,35%; população controlo: 4,8%).

A distribuição das frequências genótípicas não apresenta valor de χ^2 estatisticamente significativo ($\chi^2= 12,194$; sig= 0,203) nem mesmo quando aplicamos o teste do χ^2 para avaliar a distribuição relativa a cada fenótipo (“acetilador rápido”: $\chi^2=3,191$; sig= 0,203; “acetilador lento”: $\chi^2=5,703$; sig= 0,457).

Tabela 3.3 Distribuição das frequências genótípicas dos genes das fases I e II, nas amostras da população Portuguesa, doentes e controlo - estudo de associação pelo teste do χ^2 . Análise da distribuição das frequências após estratificação da população pelo sexo

| Genes | Doentes | Controlo | Masculino | | Feminino | |
|-------------------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|-----------|
| | | | Doentes | Controlo | Doentes | Controlo |
| <i>CYP1A1*2A</i> | | | | | | |
| T/T | 154 (80,2) | 164 (73,5) | 117 (81,8) | 108 (77,1) | 37 (75,5) | 56 (67,5) |
| T/C | 35 (18,2) | 54 (24,2) | 24 (16,8) | 31 (22,1) | 11 (22,4) | 23 (27,7) |
| C/C | 3 (1,6) | 5 (2,2) | 2 (1,4) | 1 (0,7) | 1 (2,0) | 4 (4,8) |
| χ^2 (Sig) | 2,569 (0,277) | | 1,553 (0,460) | | 1,242 (0,537) | |
| <i>CYP1A1*2C</i> | | | | | | |
| A/A | 152 (79,6) | 166 (75,8) | 115 (80,4) | 102 (74,5) | 37 (77,1) | 64 (78,0) |
| A/G | 37 (19,4) | 52 (23,7) | 27 (18,9) | 35 (25,5) | 10 (20,8) | 17 (20,7) |
| G/G | 2 (1,0) | 1 (0,5) | 1 (0,7) | 0 (0,0) | 1 (2,1) | 1 (1,2) |
| χ^2 (Sig) | 1,573 (0,455) | | 2,684 (0,261) | | 0,151 (0,927) | |
| <i>CYP2D6</i> | | | | | | |
| G/G | 139 (72,4) | 152 (67,3) | 108 (75,5) | 104 (73,2) | 31 (64,6) | 48 (57,1) |
| G/A | 44 (22,9) | 69 (30,5) | 33 (22,9) | 35 (24,6) | 11 (22,9) | 34 (40,5) |
| A/A | 9 (4,7) | 5 (2,2) | 3 (2,1) | 3 (2,1) | 6 (12,5) | 2,0 (2,4) |
| χ^2 (Sig) | 4,519 (0,104) | | 0,120 (0,942) | | 8,206 (0,017) | |
| <i>GSTP1</i> | | | | | | |
| A/A | 71 (35,9) | 79 (35,4) | 59 (40,1) | 56 (39,4) | 12 (23,5) | 23 (28,5) |
| A/G | 94 (43,5) | 117 (52,5) | 69 (46,9) | 66 (46,5) | 25 (49,0) | 51 (63,0) |
| G/G | 33 (16,6) | 27 (12,1) | 19 (12,9) | 20 (14,1) | 14 (27,5) | 7 (8,6) |
| χ^2 (Sig) | 2,056 (Sig.=0,358) | | 0,084 (0,959) | | 8,296(0,016) | |
| <i>GSTT1</i> | | | | | | |
| Presente (+) | 122 (66,7) | 174 (76,3) | 91 (66,4) | 113 (78,5) | 31(67,4) | 61(72,6) |
| Ausente (-) | 61 (33,3) | 54 (23,7) | 46 (33,6) | 31(21,5) | 15 (32,6) | 23(27,4) |
| χ^2 (Sig) | 4,090 (0,030) | | 5,123 (0,024) | | 0,393(0,531) | |
| OR, IC | 1,6 [1,04;2,49] | | 1,84 [1,08;3,13] | | | |
| <i>GSTMI</i> | | | | | | |
| Presente (+) | 108 (59,0) | 127 (55,7) | 79 (57,7) | 78 (54,2) | 29 (63,0) | 49 (58,3) |
| Ausente(-) | 75 (41,0) | 101 (44,3) | 58 (42,3) | 66 (45,8) | 17 (37,0) | 35(41,7) |
| χ^2 (Sig) | 0,456 (Sig=0,500) | | 0,348 (0,555) | | 0,275 (0,600) | |

Tabela 3.4 Distribuição das frequências genóticas, associadas ao fenótipo “acetilador rápido” ou “acetilador lento”, encontradas nas duas populações, para o gene NAT 2.

| Genótipos | Pop. Doentes(%) | Pop. Controlo (%) | χ^2 (Sig) |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|----------------|
| (Fenótipo “acetilador rápido”) | | | |
| 4/4 | 8 (4,0) | 14 (6,1) | |
| 4/6 | 4 (2,0) | 16 (7,0) | |
| 4/7 | 6 (3,0) | 6 (2,6) | |
| (Fenótipo “acetilador lento”) | | | |
| 5A/5C | 17 (9,0) | 25 (11,0) | 12,194 (0,203) |
| 5B/5A | 3 (1,6) | 10 (4,4) | |
| 5B/5B | 24 (12,0) | 32 (14,0) | |
| 5A/6 | 8 (4,2) | 8 (3,5) | |
| 5B/7 | 95 (50,3) | 91 (39,4) | |
| 6/6 | 12 (6,3) | 15 (6,6) | |
| 6/7 | 12 (6,3) | 11 (4,8) | |

A Tabela 3.5 apresenta as frequências fenotípicas encontradas para o gene *NAT2* nas duas populações e após estratificação pelo sexo. A distribuição fenotípica encontrada não revela uma associação estatisticamente significativa com a população de doentes ($\chi^2=3,347$, Sig= 0,067) embora se aproxime desse valor. Após estratificação, a população masculina revela uma associação estatisticamente significativa com o fenótipo “acetilador lento” ($\chi^2=4,167$, Sig= 0,041). Ser um indivíduo do sexo masculino com metabolismo “acetilador lento”, parece conferir um aumento da suscetibilidade para o cancro do pulmão de 1,8 vezes (OR= 1,82; IC= [1,02; 3,25]) relativamente ao fenótipo “acetilador rápido”.

Tabela 3.5 Distribuição das frequências fenotípicas do gene *NAT2* na população de doentes e controlo e após estratificação da população pelo sexo.

| <i>Fenótipo NAT 2</i> | Masculino | | Feminino | |
|-----------------------|---------------|--------------|--------------------------|----------------|
| | Doentes (%) | Controlo (%) | Doentes (%) | Controlo (%) |
| “acetilador rápido” | 36 (19,0) | 61 (14,6) | 23 (16,2) | 38 (26,0) |
| “acetilador lento” | 153 (81,0) | 168 (73,4) | 119 (83,8) | 108 (74,0) |
| χ^2 (Sig.) | 3,347 (0,067) | | 4,167 (0,041) | |
| OR; IC | | | 1,82 [1,02; 3,25] | |
| | | | | <0,001 (0,985) |

As distribuições alélicas encontradas para os diferentes genes avaliados, permitem afirmar que estas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 Distribuição das frequências alélicas dos diferentes genes estudados. Aplicação do teste do χ^2 para avaliação da distribuição segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| <i>Gene</i> | Pop.Doentes | Pop.Controlo |
|------------------|---------------|---------------|
| <i>CYP1A1*2A</i> | | |
| <i>Alelo T</i> | 343 (0,893) | 382 (0,857) |
| <i>Alelo C</i> | 41 (0,107) | 64 (0,144) |
| χ^2 (Sig) | 0,259 (0,088) | 0,007 (0,997) |
| <i>CYP1A1*2C</i> | | |
| <i>Alelo A</i> | 341 (0,893) | 384 (0,877) |
| <i>Alelo G</i> | 41 (0,107) | 54 (0,123) |
| χ^2 (Sig) | 0,214 (0,899) | 1,262 (0,532) |
| <i>CYP2D6*4</i> | | |
| <i>Alelo G</i> | 322 (0,838) | 373 (0,825) |
| <i>Alelo A</i> | 62 (0,162) | 79 (0,175) |
| χ^2 (Sig) | 1,868 (0,393) | 0,466 (0,792) |
| <i>GSTP1</i> | | |
| <i>Alelo A</i> | 236 (0,596) | 275 (0,617) |
| <i>Alelo G</i> | 160 (0,404) | 171 (0,383) |
| χ^2 (Sig) | 0,021 (0,989) | 1,468 (0,480) |

A regressão logística foi aplicada por forma a avaliar o contributo individual dos genes das fases I e II, nomeadamente *CYP1A1* (*2A e *2C), *CYP2D6*4*, *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1* e o fenótipo de *NAT2*, para o estado clínico da população de doentes (Tabela 3.7). Para tal, a população foi avaliada em função do sexo. Os genes *CYP1A1* (alelos *2A e *2C) e *CYP2D6*4* foram considerados na forma homocigótica (T/T) e na forma heterocigótica (T/C; C/C). A forma alterada foi associada a esta última, uma vez que o genótipo homocigótico raro apresenta uma percentagem muito baixa na população portuguesa (Tabela 3.3). O modelo global contendo sete variáveis independentes (*CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C*, *CYP2D6*4*, *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *NAT2*) é estatisticamente significativo para a subpopulação feminina (χ^2 (8, N= 103)= 17,601, Sig.= 0,026) mas não para a subpopulação masculina (χ^2 (8,N= 232)= 11,325, sig.= 0,184). Este modelo com as sete variáveis explica entre 15,7% (Cox e Snell R Square) a 21,7% (Nagelkerke R square) da variância encontrada na subpopulação feminina, quando comparadas as duas populações, explicando corretamente 72,0% dos casos. Apenas duas das variáveis independentes contribuem para o modelo na subpopulação feminina, são elas *CYP2D6*4* e *GSTP1*. Do modelo, podemos afirmar ainda que *CYP2D6*4*, na forma (G/G), confere um risco 3,04 vezes superior para o desenvolvimento do cancro do pulmão relativamente ao mesmo gene com genótipo “heterocigótico” (G/A, A/A). Por outro lado, o gene *GSTP1* quando avaliado como “um todo”, contribui significativamente (sig:0,003) para o modelo. Considerando os três genótipos de *GSTP1*, o genótipo (G/G), confere um risco 4,87 vezes superior comparativamente com o genótipo (A/A). A forma heterocigótica do gene não contribui significativamente para o modelo (sig = 0,375). Os restantes genes avaliados não revelam significância estatística para o modelo considerado (*CYP1A1*2A* sig = 0,462/ *CYP1A1*2C* sig = 0,161/ *GSTT1* sig = 0,859/ *GSTM1* sig = 0,595 e fenótipo *NAT2* sig = 0,677). Relativamente à subpopulação masculina, como já foi referido, o modelo não se apresenta estatisticamente significativo. No entanto, o gene *GSTT1*, com genótipo “ausente” (sig= 0,035) bem como o fenótipo “acetilador lento” do *NAT2* (sig= 0,023) contribuem de modo significativo para o indivíduo ser doente. Estes resultados estão de acordo e corroboram os resultados obtidos quando os genes foram avaliados de modo independente, por aplicação do teste do χ^2 (Tabela 3.3).

Tabela 3.7 Regressão Logística relativa à contribuição dos genes estudados para a caracterização da população de doentes. Avaliação por estratificação da população em função do sexo.

| Masculino | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|--|-------------------------|-------|-------|----|--------------|--------|-------------|
| <i>Genes</i> | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp(B) | IC (95%) |
| <i>CYP1A1*2A(T/C;C/C)</i> ¹ | | | | | | | |
| <i>T/T</i> | 0,210 | 0,351 | 0,359 | 1 | 0,549 | 1,239 | [0,62;2,46] |
| <i>CYP1A1*2C(A/G;G/G)</i> ¹ | | | | | | | |
| <i>A/A</i> | 0,149 | 0,326 | 0,209 | 1 | 0,647 | 1,161 | [0,61;2,19] |
| <i>CYP2D6*4 (G/A;A/A)</i> ¹ | | | | | | | |
| <i>G/G</i> | 0,028 | 0,315 | 0,008 | 1 | 0,929 | 1,028 | [0,56;1,91] |
| <i>GSTP1(A/A)</i> | | | 0,244 | 2 | 0,885 | | |
| <i>G/G (mut)</i> | -0,085 | 0,406 | 0,044 | 1 | 0,834 | 0,918 | [0,41;2,03] |
| <i>A/G(het)</i> | 0,099 | 0,297 | 0,111 | 1 | 0,739 | 1,104 | [0,62;1,98] |
| <i>GSTT1(presente (+))</i> | | | | | | | |
| <i>Ausente(-)</i> | 0,659 | 0,313 | 4,445 | 1 | 0,035 | 1,933 | [1,10;3,56] |
| <i>GSTM1(presente(+))</i> | | | | | | | |
| <i>Ausente</i> | -0,139 | 0,274 | 0,258 | 1 | 0,612 | 0,870 | [0,51;1,48] |
| <i>Fen.NAT2 (acet. rápido)</i> | | | | | | | |
| <i>Acet. Lento</i> | 0,779 | 0,342 | 5,199 | 1 | 0,023 | 2,180 | [1,12;4,25] |
| <i>Constante</i> | -0,983 | 0,574 | 2,939 | 1 | 0,086 | 0,374 | |

¹Para os genes *CYP1A1* (alelos *2A e *2C) e *CYP2D6*4* foram consideradas as formas homozigóticas prevalentes, *CYP1A1*2A (T/T)*, *CYP1A1*2C(A/A)* e *CYP2D6*4 (G/G)*, e associadas as formas heterozigóticas e alelo raro, *CYP1A1*2A (T/C;C/C)* e *CYP1A1*2C(A/G;G/G)* e *CYP2D6*4 (G/A;A/A)* uma vez que o genótipo homozigótico raro tem uma percentagem muito baixa na população portuguesa (Tabela 3.3).

Tabela 3.7 (continuação) Regressão Logística relativa à contribuição dos genes estudados para a caracterização da população de doentes. Avaliação por estratificação da população em função do sexo.

| Feminino <i>Genes</i> | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|---|-------------------------|-------|-------|----|--------------|--------|--------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp(B) | IC (95%) |
| <i>CYP1A1</i> *2A(<i>T/C</i> ; <i>C/C</i>) ¹ | | | | | | | |
| <i>T/T</i> | 0,396 | 0,537 | 0,542 | 1 | 0,462 | 1,49 | [0,518;4,26] |
| <i>CYP1A1</i> *2C(<i>A/G</i> ; <i>G/G</i>) ¹ | | | | | | | |
| <i>A/A</i> | 0,889 | 0,634 | 1,968 | 1 | 0,161 | 2,43 | [0,70;8,43] |
| <i>CYP2D6</i> *4 (<i>G/A</i> ; <i>A/A</i>) ¹ | | | | | | | |
| <i>G/G</i> | 1,110 | 0,537 | 4,280 | 1 | 0,039 | 3,04 | [1,06;8,69] |
| <i>GSTP1</i> (<i>A/A</i>) | | | 11,34 | 2 | 0,003 | | |
| <i>G/G (mut)</i> | 1,584 | 0,668 | 5,618 | 1 | 0,018 | 4,87 | [1,32;16,73] |
| <i>A/G(het)</i> | -0,495 | 0,558 | 0,787 | 1 | 0,375 | 0,609 | [0,20;1,82] |
| <i>GSTT1</i> (<i>presente</i> ; <i>+</i>) | | | | | | | |
| <i>Ausente(-)</i> | -0,095 | 0,536 | 0,032 | 1 | 0,859 | 0,909 | [0,32;2,60] |
| <i>GSTM1</i> (<i>presente</i> ; <i>+</i>) | | | | | | | |
| <i>Ausente</i> | -0,265 | 0,498 | 0,282 | 1 | 0,595 | 0,768 | [0,289;2,04] |
| Fen. <i>NAT2</i> (<i>acet. rápido</i>) | | | | | | | |
| <i>Acet. Lento</i> | 0,217 | 0,521 | 0,173 | 1 | 0,677 | 1,242 | [0,447;3,45] |
| <i>Constante</i> | -2,551 | 0,949 | 7,233 | 1 | 0,007 | 0,078 | |

¹Para os genes *CYP1A1* (alelos *2A e *2C) e *CYP2D6**4 foram consideradas as formas homozigóticas prevalentes, *CYP1A1**2A (*T/T*), *CYP1A1**2C (*A/A*) e *CYP2D6**4 (*G/G*) e associadas as formas heterozigóticas e alelo raro, *CYP1A1**2A (*T/C*;*C/C*), *CYP1A1**2C (*A/G*;*G/G*) e *CYP2D6**4 (*G/A*;*A/A*) uma vez que o genótipo homozigótico raro tem uma percentagem muito baixa na população portuguesa (Tabela 3.3).

3.2.1. Estudo dos polimorfismos das enzimas da fase I: *CYP1A1**2A, *CYP1A1**2C e *CYP2D6**4.

Foi realizado um estudo de associação a partir dos genótipos obtidos para as enzimas da fase I, *CYP1A1*, alelos *2A e *2C, e *CYP2D6*, alelo*4. Uma vez que as frequências genóticas encontradas para os três alelos raros, respetivamente (C/C), (G/G) e (A/A), são muito baixas, foram associadas as frequências relativas a estes alelos com as frequências dos respetivos genes na forma heterozigótica. Esta associação permitiu uma análise estatística mais fiável, cumprindo com os pré-requisitos exigidos pelos testes estatísticos aplicados, tendo em consideração que esta não iria alterar o estudo relativo à funcionalidade das enzimas consideradas.

A distribuição das combinações prevalentes, após concatenação, dos alelos *2A e *2C de *CYP1A1*, entre a população controlo e a população de doentes, bem como entre estas populações, quando comparadas dentro dos indivíduos do mesmo sexo, está descrita na Tabela 3.8. Esta distribuição não revelou associações estatisticamente significativas, nem mesmo considerando as subpopulações relativas ao sexo, muito embora se verifique uma prevalência da associação *CYP1A1**2A(T/T)/*CYP1A1**2C(A/A) em ambas as populações. Esta associação é ligeiramente superior na população de doentes relativamente à população controlo (pop. doentes: 68,8%; pop. controlo: 59,4%). Considerando as populações por sexo, esta prevalência mantém-se na população de doentes (sexo masculino: pop. doentes 54,9%; pop. controlo: 45,1% / sexo feminino: pop. doentes 62,5%; pop. controlo: 57,3%).

A análise destas combinações com as variáveis demográficas, não revela associações estatisticamente significativas. No entanto, a estratificação das duas populações pelas quatro associações genóticas prevalentes, permite-nos dividi-las em quatro sub-populações, cujos indivíduos de cada grupo têm em comum a correspondente combinação genotípica para *CYP1A1* (Tabela 3.8). O estudo de associação entre as variáveis de risco e as duas populações, para cada subpopulação considerada, revela uma prevalência de associações estatisticamente significativas em duas subpopulações com as respetivas combinações *CYP1A1**2A(T/T)/*CYP1A1**2C(A/G) e *CYP1A1**2A(T/T)/*CYP1A1**2C(A/A).

Tabela 3.8 Distribuição da frequência genótipica das combinações obtidas após concatenação de *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*, nas populações de doentes e controlo e após estratificação pelo sexo

| <i>CYP1A1*2A*2C</i> | Pop.Doente (N=189) | Pop. Controlo (N=217) | Sexo masculino | | Sexo Feminino | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|---|----------------------------|
| | | | Pop.Doente (N=141) | Pop. Controlo (N=135) | Pop.Doente (N= 48) | Pop. Controlo (N=82) |
| <i>*2A(T/C)*2C(A/G)</i> | 17 (9,0) | 22 (10,2) | 12 (8,5) | 12 (8,9) | 5 (10,5) | 10 (12,2) |
| <i>*2A(T/C)*2C(A/A)</i> | 20 (10,6) | 35 (16,1) | 13 (9,2) | 18 (13,3) | 7 (14,5) | 17 (20,7) |
| <i>*2A(T/T)*2C (A/G)</i> | 22 (11,6) | 31 (14,3) | 16 (11,3) | 23 (17,0) | 6 (12,5) | 8 (9,8) |
| <i>*2C(T/T)*2C(A/A)</i> | 130 (68,8) | 129 (59,4) | 100 (70,9) | 82 (60,8) | 30 (62,5) | 47 (57,3) |
| χ^2 (Sig) | 4,354 (0,226) | | T. E.Fisher ¹ : 3,711(0,289) | | T.E.Fisher ¹ : 1,079(0,806) | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher.

Considerando cada subpopulação individualmente, é possível evidenciar distribuições que determinam especificidades das subpopulações, para cada variável, coincidindo com a análise inicial, global (Tabela 3.9). Na subpopulação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)*, verifica-se a prevalência de indivíduos doentes no grupo do sexo masculino (76,9%) e de indivíduos maioritariamente da população controlo, na subpopulação do sexo feminino (36,4%), revelando um valor de χ^2 estatisticamente significativo (sig= 0,019). A população de doentes apresenta-se ainda prevalente quanto aos hábitos alcoólicos (66,7%), com uma significância estatística de 0,040. Relativamente aos hábitos tabágicos, o grupo de não fumadores é constituído maioritariamente por indivíduos da população controlo (59,8%), enquanto que os fumadores são predominantemente doentes (42,3%) (sig< 0,001). Ainda nesta subpopulação, é prevalente a população de doentes em indivíduos que deixaram de fumar até menos de um ano antes do diagnóstico (64,0%) (sig< 0,001) e com familiares em primeiro grau com diagnóstico de algum tipo de cancro (33,3%) (sig< 0,001). Estas associações estatisticamente significativas coincidem com as observadas aquando da caracterização da população, para o mesmo estudo entre populações, doente e controlo, nomeadamente para *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)*, evidenciando a prevalência na população de doentes.

Tabela 3.9 Distribuição das frequências das combinações entre *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*, obtidas por concatenação, relativamente às características associadas a fatores de risco. Estudo de associação por aplicação do Teste Exato de Fisher.

| <i>CYP1A1*2A*2C</i> | <i>(T/C)/(A/G)(%)</i> | | <i>(T/C)/(A/A)(%)</i> | | <i>(T/T)/(A/G)(%)</i> | | <i>(T/T)/(A/A)(%)</i> | |
|-----------------------------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|--------------------------|-----------|
| | Doentes | Controlo | Doentes | Controlo | Doentes | Controlo | Doentes | Controlo |
| Sexo | | | | | | | | |
| Masculino | 12(70,6) | 12(54,5) | 13(65,0) | 18(51,4) | 16(72,7) | 23(74,2) | 100(76,9) | 82(63,6) |
| Feminino | 5(29,4) | 10(45,5) | 7(35,0) | 17(48,6) | 6(27,3) | 8(25,8) | 30(23,1) | 47(36,4) |
| $\chi^2(\text{sig})$ | 1,043(0,307) | | 0,953(0,329) | | 0,014(0,905) | | 5,530(0,019) | |
| Hábitos alcoólicos | | | | | | | | |
| Sim | 9(56,3) | 9(45,0) | 12(63,2) | 20(60,6) | 15(75,0) | 11(35,5) | 78(66,7) | 66(53,7) |
| Não | 7(43,7) | 11(55,0) | 7(36,8) | 13(39,4) | 5(25,0) | 20(64,5) | 39(33,3) | 57(46,3) |
| $\chi^2(\text{sig})$ | 0,450(0,520) | | 0,033(0,855) | | 7,60(0,006) | | 4,23(0,040) | |
| Hábitos tabágicos | | | | | | | | |
| Não fumador | 7(41,2) | 15(68,2) | 8(40,0) | 21(60,0) | 8(36,4) | 20(64,5) | 42(32,3) | 76(59,8) |
| Fumador | 5(29,4) | 3(13,6) | 8(40,0) | 5(14,3) | 10(45,5) | 3(9,7) | 55(42,3) | 14(11,0) |
| Ex-fumador | 5(29,4) | 4(18,2) | 4(20,0) | 9(25,7) | 4(18,1) | 8(25,8) | 33(25,4) | 37(29,2) |
| $\chi^2(\text{sig})^1$ | 1,810(0,354) | | 2,920(0,232) | | 8,659(0,014) | | 34,676(<0,001) | |
| Cessaçãotabágica | | | | | | | | |
| <1 ano | 5(50,0) | 3(42,9) | 8(72,7) | 5(35,7) | 10(71,4) | 3(27,3) | 55(64,0) | 14(28,6) |
| [1;15] | 2(20,0) | 3(42,9) | 3(27,3) | 5(35,7) | 3(21,4) | 6(54,5) | 24(27,9) | 14(28,6) |
| >15anos | 3(30,0) | 1(14,2) | 0(0,0) | 4(28,6) | 1(7,2) | 2(18,2) | 7(8,1) | 21(42,8) |
| $\chi^2(\text{sig})^1$ | 1,241(0,683) | | 4,563(0,121) | | 4,733(0,078) | | 25,525(<0,001) | |
| Carga tabágica (uma) | | | | | | | | |
| <5 uma | - | - | 1(9,1) | 1(7,1) | 1(100,0) | 1(100,0) | 3(3,5) | 1(2,0) |
| [5;20] | - | - | 0(0,0) | 2(14,3) | - | - | 6(7,1) | 3(6,0) |
|]20;50[| 10(100,0) | 7(100,0) | 10(90,9) | 11(78,6) | - | - | 76(89,4) | 46(92,0) |
| $\chi^2(\text{sig})^1$ | | | 1,601(0,736) | | | | 0,322(1,00) | |
| Historia familiar | | | | | | | | |
| Sim | 4(23,5) | 3(14,3) | 6(30,0) | 3(8,8) | 6(33,3) | 1(3,2) | 40(33,3) | 8(6,2) |
| Não | 13(76,5) | 18(85,7) | 14(70,0) | 31(91,2) | 12(66,7) | 30(96,8) | 80(66,7) | 120(93,8) |
| $\chi^2(\text{sig})^1$ | 0,534(0,678) | | 4,07(0,062) | | 8,430(0,007) | | 29,106(<0,001) | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

A subpopulação com indivíduos portadores da combinação de genótipos *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/G)* apenas apresentam associações estatisticamente significativas com as variáveis hábitos alcoólicos (sig= 0,006), hábitos tabágicos (sig= 0,014) e história familiar (sig= 0,007). As restantes combinações genotípicas consideradas não apresentaram associações estatisticamente significativas com as variáveis estudadas (Tabela 3.9).

A Tabela 3.10 apresenta o estudo da distribuição das frequências das combinações de *CYP1A1* pelas variáveis clínicas estudadas. Relativamente à histologia do tumor, tendo considerado apenas as histologias prevalentes encontradas na população, verifica-se uma associação muito próxima da significância estatística entre estas e as combinações consideradas (sig=0,051). Estão assinaladas as frequências cujos valores dos resíduos ajustados revelam maior contribuição para o valor do teste do χ^2 . No carcinoma das pequenas células evidencia-se a combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)* enquanto que para o adenocarcinoma a maior contribuição está repartida entre *CYP1A1*2A(T/C)/CYP1A1*2C(A/A)* e *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)*. Relativamente ao estadió, muito embora o estudo de associação não apresente significância estatística (sig=0,084), o estadió IV revela-se predominante em qualquer subpopulação considerada.

Tabela 3.10 Distribuição das frequências encontradas após associação dos genótipos de *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*, por concatenação, relativamente às características clínicas, respectivamente histologia do tumor, localização tumoral, estadio e sobrevivência.

| <i>CYP1A1*2A/CYP1A1*2C</i> | (T/C)/(A/G)(%) | (T/C)/(A/A)(%) | (T/T)/(A/G)(%) | (T/T)/(A/A)(%) |
|------------------------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|
| Histologia | | | | |
| Carc.peq. células | 1(2,4) | 4(9,8) | 3(7,3) | 33 ² (80,5) |
| Carc.epidermóide | 4(8,7) | 1 ² (2,2) | 6(13,0) | 35(76,1) |
| Adenocarcinoma | 10(13,0) | 12 ² (15,6) | 11(14,3) | 44 ² (57,1) |
| χ^2 (Sig) ¹ | | 12,170 (N=164; 0,051) | | |
| Localização tumoral | | | | |
| Lobo sup.,pulmão esq. e dir. | 4(5,2) | 10(13,0) | 10(13,0) | 53(68,8) |
| Lobo inf.,pulmão esq. e dir. | 5(12,3) | 1(2,4) | 3(7,3) | 32(78,0) |
| χ^2 (Sig) ¹ | | 5,864 (N=118; 0,109) | | |
| Estadio | | | | |
| IIIA | - | 1(6,2) | 1(6,2) | 14(87,6) |
| IIIB | 1(7,7) | 3(23,1) | 4(30,8) | 5(38,4) |
| IV | 9(10,0) | 8(8,9) | 10(11,1) | 63(70,0) |
| χ^2 (Sig) ¹ | | 9,530 (N=119; 0,084) | | |
| Sobrevivência | | | | |
| <2 anos | 6(11,8) | 7(13,7) | 10(19,6) | 28(54,9) |
| >2 anos | - | 2(7,1) | 4(14,3) | 22(78,6) |
| χ^2 (Sig) ¹ | | 5,506 (N=79; 0,125) | | |

¹ Aplicação do Teste Exato de Fisher.

² Células cujos valores mais contribuem para o resultado χ^2 .

Tendo em consideração o envolvimento deste gene no metabolismo dos carcinogéneos presentes no fumo do tabaco, realizou-se uma estratificação da população relativamente aos seus hábitos tabágicos. A análise global após aplicação do teste do χ^2 , entre o grupo de doentes e o grupo controlo, não apresenta valores de associação estatisticamente significativos (Tabela 3.11).

Tabela 3.11 Distribuição das frequências encontradas após associação dos genótipos de *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*, por concatenação, entre doentes e controlo, após estratificação pelos hábitos tabágicos.

| <i>CYP1A1*2A/CYP1A1*2C</i> | (T/C)/(A/G)(%) | (T/C)/(A/A)(%) | (T/T)/(A/G)(%) | (T/T)/(A/A)(%) |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Não Fumador | | | | |
| Doente (N=65) | 7(10,8) | 8(12,3) | 8(12,3) | 42(64,6) |
| Controlo (N=131) | 15(11,4) | 21(15,9) | 20(15,2) | 76(57,5) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 1,006(0,828) | | | |
| Fumador | | | | |
| Doente (N=124) | 10(8,1) | 12(9,7) | 14(11,2) | 88(71,0) |
| Controlo (N=85) | 7(8,4) | 14(16,9) | 11(13,3) | 51(61,4) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 2,885 (0,405) | | | |

¹ Aplicação do Teste Exacto de Fisher

O número reduzido de indivíduos na subpopulação *CYP1A1*2A(T/C)/CYP1A1*2C(A/G)* conduziu a que esta fosse excluída dos estudos subsequentes. A Tabela 3.12 apresenta a distribuição das frequências e respetivo estudo de associação entre as restantes três subpopulações e as variáveis clínicas avaliadas, quando a população de doentes é agrupada em função dos seus hábitos tabágicos.

A subpopulação *CYP1A1*2A(T/C)/CYP1A1*2C(A/A)* apresenta o menor número de indivíduos conduzindo diversas vezes à presença de valores nulos, comprometendo a fidelidade do resultado. Será, no entanto, de referir a prevalência de indivíduos com adenocarcinoma no grupo dos não fumadores (61,3%) e a prevalência do carcinoma epidermoide para o grupo de fumadores (83,8%), na subpopulação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)*. Os dois grupos avaliados, fumador e não fumador, apresentam prevalência de cancro no lobo superior, do pulmão esquerdo e direito, bem como do estadio IV. Apenas foram consideradas na variável estadio as categorias que se revelaram prevalentes na população, IIIA, IIIB e IV (Tabela 3.12). O grupo de fumadores, demonstrou a existência de uma associação significativa entre as combinações genotípicas e o estadio revelando uma predominância de indivíduos *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)* fumadores (79,3%), em estadio IV, (χ^2 (Teste exato de Fisher)=12,188 /Sig=0,007).

Tabela 3.12 Distribuição das frequências encontradas após associação dos genótipos de *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*, por concatenação e após estratificação por hábitos tabágicos, relativamente às características clínicas, histologia do tumor, localização tumoral, estadio e sobrevivência.

| | | <i>CYP1A1*2A/CYP1A1*2C</i> | (T/C)/(A/A)(%) | (T/T)/(A/G)(%) | (T/T)/(A/A)(%) |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------|----------------|
| Histologia do tumor | Não Fumador | | | | |
| | | Carc.peq. células | - | 1(8,3) | 11(91,7) |
| | | Carc.epidermóide | - | 1(20,0) | 4(80,0) |
| | | Adenocarcinoma | 6(19,4) | 6(19,4) | 19(61,3) |
| | | χ^2 (Sig) ¹ | 4,208 (N=48; 0,327) | | |
| | Fumador | | | | |
| | | Carc.peq. células | 4(14,3) | 2(7,1) | 22(78,6) |
| | | Carc.epidermóide | 1(2,7) | 5(13,5) | 31(83,8) |
| | | Adenocarcinoma | 6(16,7) | 5(13,9) | 25(69,4) |
| | | χ^2 (Sig) ¹ | 5,229(N=101;0,256) | | |
| Localização tumoral | Não Fumador | | | | |
| | | Lobo sup., pulmão esq.e dir. | 5(21,7) | 4(17,4) | 14(60,9) |
| | | Lobo inf., pulmão esq. e dir. | - | - | 9(100,0) |
| | | χ^2 (Sig) ¹ | 3,928(N=32;0,120) | | |
| | Fumador | | | | |
| | | Lobo sup., pulmão esq.e dir. | 5(10,0) | 6(12,0) | 39(78,0) |
| | Lobo inf., pulmão esq. e dir. | 1(3,7) | 3(11,1) | 23(85,2) | |
| | χ^2 (Sig) ¹ | 0,870(N=77;0,678) | | | |
| Estadio | Não Fumador | | | | |
| | | IIIA | 1(25,0) | - | 3(75,0) |
| | | IIIB | - | - | 3(100,0) |
| | | IV | 3(12,0) | 5(20,0) | 17(68,0) |
| | | χ^2 (Sig) ¹ | 2,429 (N=33;0,666) | | |
| | Fumador | | | | |
| | | IIIA | - | 1(8,3) | 11(91,7) |
| | | IIIB | 1(16,7) | 4(66,6) | 1(16,7) |
| | IV | 5(8,6) | 7(12,1) | 46(79,3) | |
| | χ^2 (Sig) ¹ | 12,188(N=76;0,007) | | | |
| Sobrevivência | Não Fumador | | | | |
| | | < 2 anos | 6(37,5) | 2(12,5) | 8(50,0) |
| | | >2 anos | - | 1(9,1) | 10(90,9) |
| | | χ^2 (Sig) ¹ | 5,878 (N=27;0,074) | | |
| | Fumador | | | | |
| | | < 2 anos | 1(3,4) | 8(27,6) | 20(69,0) |
| | >2 anos | 2(11,8) | 3(17,6) | 12(70,6) | |
| | χ^2 (Sig) ¹ | 1,606 (0,533) | | | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

Dois estudos de regressão logística, realizados em função dos resultados obtidos e descritos nas Tabelas que os antecederam, são apresentados nas Tabelas 3.13 e 3.14. O primeiro envolve 93 indivíduos doentes e pretende avaliar a contribuição das três combinações genotípicas na prevalência observada do estadio IV relativamente ao estadio IIIB. O modelo revelou-se estatisticamente significativo ($\chi^2(df=2,N=93)=6,159/Sig=0,046$) permitindo distinguir a população em estadio IV da população com estadio IIIB. Globalmente, o modelo explica entre 6,4% (Cox and Snell R square) a 12,0% (Nagelkerke R square) da variância observada no estadio, e classifica correctamente 87,1% dos casos analisados. Como se verifica, apenas a combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)* apresenta uma contribuição estatisticamente significativa (Sig=0,032), apresentando um risco 5,0 vezes superior relativamente à combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/G)*. Quando a esta variável associamos o consumo de tabaco (Tabela 3.14), a combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)* aumenta o seu fator de risco para 5,97 (Sig=0,022). Este novo modelo contendo as duas variáveis predictoras, inclui 93 indivíduos na análise, e apresenta-se como estatisticamente significativo ($\chi^2(df=3,N=93)=8,512/Sig=0,037$) permitindo, distinguir a população entre os dois estadios. O modelo integral explica entre 8,7% (Cox and Snell R square) a 16,3 % (Nagelkerke R square) da variância observada no estadio e classifica correctamente 87,1% dos casos analisados. Muito embora, o intervalo de confiança de 95%, para a referida combinação, envolva um limite superior revelador de perda de confiança na análise efetuada, o limite inferior é superior a um, revelando um risco efectivo associado à combinação considerada.

Tabela 3.13 Estudo de Regressão logística relativa à contribuição da combinação dos genótipos dos alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* para a condição de ser doente em estadio IV, relativamente ao estadio IIIB.

| Características | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|---|-------------------------|-------|-------|----|--------------|---------|---------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp (B) | IC (95%) |
| <i>CombinaçãoCYPs</i> (<i>CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/G)</i>) | | | 6,103 | 2 | 0,047 | | |
| <i>CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)</i> | 1,617 | 0,752 | 4,623 | 1 | 0,032 | 5,040 | [1,154;22,02] |
| <i>CYP1A1*2A(T/C)/CYP1A1*2C(A/A)</i> | 0,065 | 0,899 | 0,005 | 1 | 0,943 | 1,067 | [0,183;6,213] |
| Constante | 0,916 | 0,592 | 2,399 | 1 | 0,121 | 2,500 | |

Assim, este intervalo permite afirmar que esta combinação de genótipos associada a outras variáveis predictoras, tais como hábitos tabágicos, confere um acréscimo no risco associado ao estadió IV. O consumo de tabaco não apresenta, por si só, uma contribuição estatisticamente significativa (Sig=0,125) neste modelo, muito embora influencie o risco relativo da combinação de genótipos considerada (Tabela 3.14).

Tabela 3.14 Estudo de Regressão logística relativa à contribuição das variáveis hábitos tabágicos e a combinação dos genótipos dos alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* para a condição de ser doente em estadió IV, relativamente ao estadió IIIB.

| Características | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|---|-------------------------|-------|-------|----|--------------|---------|----------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp (B) | IC (95%) |
| Hábitos Tabágicos (Não fumador) | | | | | | | |
| Fumador | 1,038 | 0,677 | 2,355 | 1 | 0,125 | 2,825 | [0,750;10,640] |
| <i>Combinação</i> | | | 6,283 | 1 | 0,043 | | |
| <i>CYPs(CYP1A1*2A(TT)/CYP1A1*2C(A/G))</i> | | | | | | | |
| <i>CYP1A1*2A(TT)/CYP1A1*2C(A/A)</i> | 1,787 | 0,783 | 5,209 | 1 | 0,022 | 5,970 | [1,287;27,684] |
| <i>CYP1A1*2A(TC)/CYP1A1*2C(A/A)</i> | 0,341 | 0,943 | 0,131 | 1 | 0,718 | 1,406 | [0,221;8,933] |
| Constante | 0,134 | 0,780 | 0,030 | 1 | 0,863 | 1,143 | |

A Tabela 3.15 apresenta as frequências encontradas após combinação dos três genótipos relativos aos genes da fase I, *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP2D6*4*. O valor do teste é revelador de ausência de associação entre as combinações prevalentes e as duas populações estudadas. Refira-se, no entanto, a elevada frequência da combinação relativa aos três genótipos na forma homozigótica *CYP1A1*2A (TT)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G)* (51,1%) na população de doentes, bem como a prevalência da combinação *CYP1A1*2A (TT)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)* (22,3%) na população controlo.

Tabela 3.15 Distribuição das frequências encontradas após associação, por concatenação, dos três genótipos relativos aos genes *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP2D6*4*, entre doentes e controlos.

| ¹ <i>CYP1A1*2A/CYP1A1*2C/CYP2D6*4</i> | Pop. Doentes (%) | Pop. Controlo (%) |
|--|---------------------|-------------------|
| (T/C)/(A/G)/(G/G) | 13(7,3) | 19 (9,6) |
| (T/C)/(A/A)/(G/G) | 19 (10,7) | 27 (13,7) |
| (T/T)/(A/G)/(G/G) | 20 (11,2) | 28 (14,2) |
| (T/T)/(A/A)/(G/G) ² | 91 (51,1) | 79 (40,1) |
| (T/T)/(A/A)/(G/A) ² | 35 (19,7) | 44 (22,3) |
| X ² (Sig) | 4,772 (N=375;0,312) | |

¹As associações apresentadas dizem respeito às prevalentes dentro das associações encontradas após análise por concatenação, tendo sido selecionadas por se apresentarem em número suficiente de forma a procedermos com os estudos estatísticos.

² Células cujo valores contribuem de forma significativa para o resultado de teste do χ^2 (|Adjusted Residues|>1.96).

A distribuição das duas combinações prevalentes pelas diversas características das populações evidencia a associação destas com alguns fatores de risco (Tabela 3.16).

A combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G)* apresenta uma prevalência de associações com a maioria das características associadas ao risco, comparativamente com *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)*. No entanto, esta não apresenta uma associação estatisticamente significativa relativamente ao sexo. Relativamente a esta variável, é a combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)* que apresenta um valor de χ^2 estatisticamente significativo (sig=0,019).

Tabela 3.16 Distribuição das frequências encontradas, após combinação, por concatenação, dos genótipos de *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP2D6*4*, entre as variáveis de risco.

| População | <i>CYP1A1*2A, CYP1A1*2C, CYP2D6*4</i> | | | |
|-------------------------------------|---|----------|-------------------------------------|----------|
| | <i>(T/T)/(A/A)/(G/G)</i> | | <i>(T/T)/(A/A)/(G/A)</i> | |
| | Doentes | Controlo | Doentes | Controlo |
| Sexo | | | | |
| Feminino | 21(23,1) | 25(31,6) | 8(22,9) | 22(50,0) |
| Masculino | 70(76,9) | 54(68,4) | 27(77,1) | 22(50,0) |
| χ^2 (Sig) OR [IC] | 1,573(0,229) | | 6,097(0,019)3,38[1,26;9,04] | |
| Antecedentes | | | | |
| Familiares | | | | |
| Sim | 31(36,9) | 3(3,8) | 9(27,3) | 5(11,4) |
| Não | 53(63,1) | 75(96,2) | 24(72,7) | 39(88,6) |
| χ^2 (Sig) ¹ OR [IC] | 26,654(<0,001)14,62[4,25;50,34] | | 3,208(0,134) | |
| Hábitos alcoólicos | | | | |
| Sim | 55(68,8) | 35(46,7) | 21(61,7) | 29(67,4) |
| Não | 25(31,2) | 40(53,3) | 13(38,3) | 14(32,6) |
| χ^2 (Sig)OR [IC] | 7,75(0,006)2,5[1,3;4,8] | | 0,269(0,637) | |
| Hábitos tabágicos | | | | |
| Sim | 61(67,0) | 32(41,0) | 25(71,4) | 16(36,4) |
| Não | 30(33,0) | 46(59,0) | 10(28,6) | 28(63,6) |
| χ^2 (Sig) OR [IC] | 11,48(0,001)2,92[1,56;5,48] | | 9,601(0,003)4,38[1,68;11,39] | |
| Cessação tabágica | | | | |
| <1ano | 41(67,2) | 10(31,4) | 14(60,9) | 4(26,7) |
| [1;15] anos | 15(24,6) | 11(34,3) | 7(30,4) | 3(20,0) |
| >15 anos | 5(8,2) | 11(34,3) | 2(8,7) | 8(53,3) |
| χ^2 (Sig) ¹ OR [IC] | 13,687(0,001) | | 9,013(0,011) | |
| Carga Tabágica (uma) | | | | |
| <5uma | 1(1,7) | 1(3,1) | 2(8,0) | - |
| [5;20]uma | 4(6,9) | - | 2(8,0) | 2(13,3) |
| [20;50]uma | 53(91,4) | 31(96,9) | 21(84,0) | 13(86,7) |
| χ^2 (Sig) ¹ OR [IC] | 2,456(0,293) | | 1,475(0,478) | |

¹Aplicação do teste Exacto de Fisher

O estudo realizado com os três genes combinados e as variáveis clínicas, histologia do tumor, localização tumoral, estadio e sobrevivência está descrito na Tabela 3.17. Apenas se regista uma associação estatisticamente significativa para o

estadiamento ($\chi^2=9,367$;Sig=0,024), evidenciando ainda a prevalência da subpopulação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G)* no estádio IV.

Tabela 3.17 Distribuição das frequências encontradas após combinação dos genótipos de *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP2D6*4*, por concatenação, entre as variáveis clínicas.

| Caract. Clínicas | <i>CYP1A1*2A/ CYP1A1*2C/ CYP2D6*4</i> | | | | |
|----------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>(T/C)/(A/G)/(G/G)</i> | <i>(T/C)/(A/A)/(G/G)</i> | <i>(T/T)/(A/G)/(G/G)</i> | <i>(T/T)/(A/A)/(G/G)</i> | <i>(T/T)/(A/A)/(G/A)</i> |
| Hist. do tumor | | | | | |
| Carc.peq. células | 1(2,6) | 4(10,3) | 3(7,7) | 22(56,4) | 9(23,0) |
| Carc.epidermóide | 3(6,7) | 1(2,2) | 6(13,3) | 23(51,1) | 12(26,7) |
| Adenocarcinoma | 7(10,1) | 11(15,9) | 9(13,1) | 34(49,3) | 8(11,6) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 11,811 (N=153;0,148) | | | | |
| Local. tumoral | | | | | |
| Lobo sup..pulmão esq.e dir. | 3(4,2) | 10(13,7) | 9(12,3) | 36(49,3) | 15(20,5) |
| Lobo inf., pulmão esq. e dir. | 4(10,0) | 1(2,5) | 3(7,5) | 22(55,0) | 10(25,0) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 5,723 (N=113;0,217) | | | | |
| Estadio | | | | | |
| III A | - | 1(6,7) | 1(6,7) | 7(46,6) | 6(40,0) |
| III B | 1(8,3) | 3(25,0) | 4(33,3) | 2(16,7) | 2(16,7) |
| IV | 7(8,1) | 7(8,1) | 10(11,6) | 46(53,6) | 16(18,6) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 13,134 (N=113;0,056)/ 9,367(N=98;0,024) | | | | |
| Sobrevivência | | | | | |
| < 2 anos | 5(10,4) | 6(12,5) | 9(18,8) | 16 ² (33,3) | 12 ² (25,0) |
| >2anos | - | 2(7,4) | 4(14,8) | 17 ² (63,0) | 4 ² (14,8) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 7,055(N=75;0,121) | | | | |

¹Aplicação Teste Exacto de Fisher

² Células cujo valores contribuem de forma significativa para o resultado de teste do χ^2 (|Adjusted Residues|>1.96).

O número reduzido de indivíduos nas diferentes combinações de genótipos inviabilizou muitos dos estudos estatísticos. Assim, e porque duas das combinações encontradas se revelaram prevalentes nas duas populações, *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)* e *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G)*, apenas estas foram utilizadas na análise subsequente envolvendo todas as variáveis clínicas avaliadas no questionário,

após estratificação da população em função dos hábitos tabágicos (Tabela 3.18). Esta análise revelou uma associação estatisticamente significativa entre a histologia do tumor e a combinação *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G)* (Sig=0,044) e entre a metastização, o estadio e *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)* (respectivamente, Sig=0,050 e Sig=0,013). Saliente-se que o número reduzido de indivíduos poderá eventualmente conduzir a falsos positivos.

Tabela 3.18 Estudo de associação entre as duas combinações prevalentes dos três génotipos, *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP2D6*4* e as variáveis clínicas, após estratificação pelos hábitos tabágicos.

| Hábitos Tabágicos | <i>CYP1A1*2A, CYP1A1*2C, CYP2D6*4</i> | | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | <i>(T/T)/(A/A)/(G/A)</i> | | <i>(T/T)/(A/A)/(G/G)</i> | |
| | Não | Sim | Não | Sim |
| Localização tumoral | | | | |
| Lobo sup., pulmão esq.e dir | 4(57,1) | 11(61,1) | 10(50,0) | 26(61,9) |
| Lobo inf., pulmão esq.e dir | 3(42,9) | 7(38,9) | 10(50,0) | 16(38,1) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 0,002 (1,00) | | 0,33 (1,00) | |
| Metastização | | | | |
| Sim | 1(11,1) | 13(52,0) | 13(43,0) | 24(40,7) |
| Não | 8(88,9) | 12(48,0) | 17(56,7) | 35(59,3) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 4,568(0,050) | | 0,058(0,824) | |
| Histologia | | | | |
| Carc. Epidermoide | 1(14,3) | 11(50,0) | 3(12,0) | 20(37,0) |
| Carc. Células Peq. | 2(28,6) | 7(31,8) | 7(28,0) | 15(27,8) |
| Adenocarcinoma | 4(57,1) | 4(18,2) | 15(60,0) | 19(35,2) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 4,213(0,140) | | 6,202(0,044) | |
| Estadio | | | | |
| Até IIIA | 2(40,0) | 4(21,0) | 1(5,6) | 6(16,2) |
| IIIB | 2(40,0) | - | 1(5,6) | 12,7(0) |
| IV | 1(20,0) | 15(78,9) | 16(88,8) | 30(88,1) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 8,203(0,013) | | 1,570(0,465) | |
| Sobrevivência | | | | |
| <2 anos | 5(100,0) | 7(63,6) | 3(25,0) | 13(61,9) |
| >2 anos | - | 4(36,4) | 9(75,0) | 8(38,1) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 2,424(0,245) | | 4,164(0,071) | |
| Bilateralidade | | | | |
| Sim | - | 8(32,0) | 6(20,0) | 11(19,3) |
| Não | 9(100,0) | 17(68,0) | 24(80,0) | 46(80,7) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 3,766(0,077) | | 0,006(1,00) | |
| Multifocalidade | | | | |
| Sim | 2(22,2) | 5(21,7) | 7(23,3) | 9(16,7) |
| Não | 7(77,8) | 18(78,3) | 23(76,7) | 45(83,3) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 0,001(1,00) | | 0,556(0,564) | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

3.2.2. Estudo dos polimorfismos das enzimas da fase II

3.2.2.1. Glutationas S-transferases, *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1*.

Foram realizados estudos de associação envolvendo estes genes, após combinação dos genótipos por concatenação, e as variáveis associadas a fatores de risco e clínicas, aos quais se seguiram os estudos de modelos envolvendo estas variáveis. A confirmação e avaliação da contribuição de cada variável nesses modelos foi obtida por regressão logística

A Tabela 3.19 apresenta a distribuição das combinações de genótipos prevalentes de *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* entre as duas populações estudadas e após estratificação em função do sexo. A aplicação do teste do χ^2 revela uma associação estatisticamente significativa entre a distribuição encontrada e as populações estudadas, evidenciando diferenças entre estas (sig= 0,020). A análise dos valores dos resíduos ajustados indica que *GSTP1(A/G)/GSTT1neg/GSTM1posit* e *GSTP1(A/G)/GSTT1posit/GSTM1posit* são combinações que contribuem de forma significativa para o valor de χ^2 . Após estratificação pelo sexo, apenas no grupo de doentes do sexo masculino, *GSTP1(A/G)/GSTT1neg/GSTM1posit* possui um valor de resíduo ajustado revelador de uma contribuição significativa para o resultado do referido teste.

Na sequência desta análise, pretendeu-se determinar quais as variáveis demográficas e de risco que poderiam associar-se a uma destas combinações genóticas, contribuindo para definir um “perfil” do indivíduo doente. Procedeu-se à análise por regressão logística, estabelecendo um modelo que contém três variáveis independentes, sexo, hábitos tabágicos e as associações prevalentes dos três genes das glutationsas, respetivamente *GSTP1(A/G)/GSTT1neg/GSTM1posit*, *GSTP1(A/A)/GSTT1neg/GSTM1posit* e *GSTP1(A/G)/GSTT1posit/GSTM1posit*. Este modelo revelou-se estatisticamente significativo ($\chi^2(5, N=146)=30,166$, sig<0,001), explica entre 18,7 % (Cox e Snell R square) e 25,9% (Nagelkerke R square) da

variância observada na população de doentes e classifica corretamente 68,5% dos doentes. Das variáveis consideradas duas contribuem significativamente para o modelo.

Tabela 3.19 Distribuição da associação de genótipos dos genes das glutatonas, *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1*, por concatenação.

| <i>GSTP1/GSTT1/GSTM1</i> ² | Doentes N (%) | Controlo N (%) | Masculino | | Feminino | |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
| | | | Doentes N (%) | Controlo N (%) | Doentes N (%) | Controlo N (%) |
| <i>(A/G/neg/posit</i> ¹ | 29 (18,5) | 14 (7,8) | 23 (18,9) | 8 (7,1) | 6 (17,1) | 6 (8,9) |
| <i>(A/G)/posit/neg</i> | 42 (26,8) | 49 (27,2) | 30 (24,6) | 31 (27,4) | 12 (34,4) | 18 (26,9) |
| <i>(A/G)/posit/posit</i> ¹ | 26 (16,6) | 49 (27,2) | 20 (16,4) | 26 (23,0) | 6 (17,1) | 23 (34,3) |
| <i>(A/A)/neg/posit</i> | 16 (10,2) | 12 (6,7) | 12 (9,8) | 6 (5,3) | 4 (11,4) | 6 (9,0) |
| <i>(A/A)/posit/neg</i> | 16 (10,2) | 21 (11,7) | 16 (13,1) | 16(14,2) | - | 5 (7,5) |
| <i>(A/A)/posit/posit</i> | 28 (17,7) | 35 (19,4) | 21(17,2) | 26 (23,0) | 7 (20,0) | 9 (13,4) |
| χ^2 (Sig) | 13,342 (0,020) | | T.Fisher10,259 (0,066) | | T.Fisher7,425 (0,179) | |

¹ Células cujo valores contribuem de forma significativa para o resultado de teste do χ^2 ($|Adjusted\ Residues|>1.96$).

² Para o gene *GSTP1* foi considerado “wt” (“wild type”) como representativo de “A/A” e a associação “heterozigótico + mutado” representada por “A/G”. Os genótipos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foram representados por “posit” quando o gene estava presente e por “neg” a quando da deleção do gene.

Avaliando a contribuição da variável hábitos tabágicos globalmente (Tabela 3.20), esta contribui significativamente para o modelo (Sig=0,015). Considerando as suas categorias verificamos que o risco de um indivíduo fumador ser doente, relativamente a um não fumador, é 4,796 vezes superior. Contrariamente, um ex-fumador, indivíduo que deixou de fumar entre um ano a quinze anos após o diagnóstico, não contribui significativamente para o “perfil” da população de doentes (Sig=0,103).

A variável “glutatonas”, possui três associações que se revelaram prevalentes na população de doentes e que contribuem, na globalidade, significativamente para a análise (Sig=0,005). Este estudo revela que, na população de doentes, a associação *GSTP(A/G)/GSTT1neg/GSTM1posit* confere um risco 3,79 vezes superior relativamente à associação *GSTP1(A/G)/GSTT1posit/GSTM1posit* enquanto que a associação

GSTP1(A/A)/GSTT1neg/GSTM1posit, embora significativa (sig=0,039), possui um risco inferior, 2,72.

Tabela 3.20 Regressão logística relativa à contribuição da associação de genótipos das Glutationas e algumas variáveis demográficas para a suscetibilidade para o cancro do pulmão

| Características | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|--|-------------------------|-------|--------|----|--------------|---------|-----------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp (B) | IC (95%) |
| Sexo (feminino) | | | | | | | |
| Masculino | 0,430 | 0,468 | 0,846 | 1 | 0,358 | 1,538 | [0,615; 3,848] |
| Hábitos Tabágicos (Não fumador) | | | 8,409 | 1 | 0,015 | | |
| Fumador | 1,568 | 0,543 | 8,346 | 1 | 0,004 | 4,796 | [1,656; 13,894] |
| Ex-Fumador | 0,802 | 0,491 | 2,662 | 1 | 0,103 | 2,229 | [0,851; 6,841] |
| Glutationas (<i>GSTP1(A/G/ GSTT1</i> (posit)/ <i>GSTM1</i> (posit)) | | | 10,689 | 1 | 0,005 | | |
| (<i>A/G</i>) / <i>neg</i> / <i>posit</i> * | 1,332 | 0,433 | 9,450 | 1 | 0,002 | 3,789 | [1,621; 8,859] |
| (<i>A/A</i>) / <i>neg</i> / <i>posit</i> | 1,000 | 0,485 | 4,253 | 1 | 0,039 | 2,718 | [1,051; 7,030] |
| Constante | -1,511 | 0,381 | 15,739 | 1 | 0,000 | 0,221 | |

Nenhuma das outras variáveis de risco, carga tabágica, cessação tabágica, tempo de consumo e hábitos alcoólicos revelaram qualquer contribuição ou risco para a população de doentes pelo que foram excluídas da análise.

Foi ainda realizado o estudo para avaliação da contribuição individual das glutations, para o perfil de “ser doente”, em associação com as variáveis clínicas, nomeadamente bilateralidade, multifocalidade, metastização, localização tumoral e histologia do tumor.

A Tabela 3.21 apresenta a distribuição e o correspondente valor do teste do χ^2 , para cada um dos genes das GSTs, em função da variável clínica “histologia do tumor”. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os três genes e a histologia do tumor (*GSTP1*: $\chi^2=7,118$, Sig=0,128/ *GSTT1*: $\chi^2=0,817$, Sig=0,662/ *GSTM1*: $\chi^2=4,317$, Sig=0,116). No entanto, a distribuição revela uma predominância do

genótipo (A/A) para o carcinoma das células pequenas (52,4%) enquanto que os restantes tipos histológicos evidenciam uma prevalência dos heterozigóticos. Considerando a população em função do sexo, a distribuição genotípica do gene *GSTP1*, no sexo masculino, revela uma associação estatisticamente significativa com a histologia (sig= 0,048).

Tabela 3.21 Distribuição das frequências genotípicas dos genes das glutationas, *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTMI* em função da variável clínica, histologia do tumor, tendo em consideração as histologias prevalentes e após estratificação da população em função do sexo

| Histologia/Genes | Masculino | | | | | | Feminino | | |
|-----------------------------|---------------|----------|----------|---------------------|----------|---------|---------------|----------|----------|
| <i>GSTP1</i> | A/A | A/G | G/G | A/A | A/G | G/G | A/A | A/G | G/G |
| Carc. células peq. | 22(52,4) | 16(38,1) | 4(9,5) | 20(60,6) | 11(33,3) | 2 (6,1) | 2(22,2) | 5(55,6) | 2 (22,2) |
| Carc. epiderm. | 17(34,0) | 24(48,0) | 9(18,0) | 16(34,8) | 21(45,7) | 9(19,5) | 1(25,0) | 3(75,0) | - |
| Adenocarcinoma | 23(28,0) | 40(50,0) | 17(22,1) | 15(31,2) | 27(56,3) | 6(12,5) | 8(25,0) | 13(40,6) | 11(34,4) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 7,118 (0,128) | | | 9,60 (0,048) | | | 4,317 (0,116) | | |

| <i>GSTT1</i> ² | Masculino | | Feminino | |
|-----------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | Presente (%) | Ausente (%) | Presente (%) | Ausente (%) |
| Carc. células peq. | 27 (71,1) | 11 (28,9) | 22 (73,3) | 8 (26,7) |
| Carc. Epiderm. | 29 (61,7) | 18 (38,3) | 26 (59,1) | 18 (40,9) |
| Adenocarcinoma | 48 (65,8) | 25 (34,2) | 28 (63,6) | 16 (36,4) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 0,817 (0,662) | | 1,597 (0,463) | |
| | | | 1,187 (0,72) | |

| <i>GSTMI</i> ² | Masculino | | Feminino | |
|-----------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | Presente (%) | Ausente (%) | Presente (%) | Ausente (%) |
| Carc. células peq. | 18 (47,4) | 20 (52,6) | 13 (43,3) | 17 (56,7) |
| Carc. Epiderm. | 32 (68,1) | 15 (31,9) | 31 (70,5) | 13 (29,5) |
| Adenocarcinoma | 47 (64,4) | 26 (35,6) | 27 (61,4) | 17 (38,6) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 4,317 (0,116) | | 5,517 (0,060) | |
| | | | 1,545 (0,556) | |

¹ Aplicação do Teste Exacto de Fisher

² As percentagens dizem respeito às dos genótipos dentro de cada tipo histológico.

Os estudos de associação apresentados nas Tabelas 3.22 e 3.23 foram realizados estratificando a população, primeiro em função dos seus hábitos tabágicos (Tabela 3.22) e posteriormente em função do sexo e hábitos tabágicos em simultâneo (Tabela 3.23), tendo em consideração a importância destas variáveis nos estudos de associação realizados anteriormente.. Desta análise confirmou-se a associação da distribuição genotípica de *GSTPI* relativamente ao tipo histológico do tumor. A aplicação do teste exato de Fisher revela uma clara associação entre *GSTPI* e os grupos histológicos, no grupo dos doentes fumadores ($\chi^2= 13,529$, Sig= 0,007, Tabela 3.22), mesmo quando estratificados pelo sexo ($\chi^2= 13,599$, Sig= 0,006, Tabela 3.23). Os grupos de ex-fumadores e não fumadores não apresentaram associação estatisticamente significativa entre a distribuição genotípica de *GSTPI* e as três principais categorias histológicas (Ex-fumadores: $\chi^2= 3,727$, Sig= 0,449; Não fumadores: $\chi^2= 2,588$, Sig= 0,673, Tabela 3.22). Na estratificação por hábitos tabágicos e sexo, simultaneamente, o número reduzido de não fumadores masculinos e de indivíduos do sexo feminino com hábitos tabágicos não permitiu o estudo de associação, por violação dos pré-requisitos do referido teste.

Tabela 3.22 Distribuição das frequências genotípicas de *GSTPI* em função dos grupos histológicos prevalentes, após estratificação da população pelos hábitos tabágicos.

| Histologia/ <i>GSTPI</i> | A/A | A/G | G/G |
|-----------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| Fumadores | | | |
| Carc peq células | 15 (68,2) | 5 (22,7) | 2 (9,1) |
| Carc. epidermóide | 11 (37,9) | 12 (41,4) | 6 (20,7) |
| Adenocarcinoma | 4 (17,4) | 16 (69,6) | 3 (13,0) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 13,529 (0,007) | | |
| Ex-Fumadores | | | |
| Carc peq células | 3 (37,5) | 5 (62,5) | - |
| Carc. epidermóide. | 4 (26,7) | 8 (53,3) | 3 (20,0) |
| Adenocarcinoma | 9 (50,0) | 6 (33,3) | 3 (16,7) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 3,727 (0,449) | | |
| Não Fumadores | | | |
| Carc peq células | 4 (33,3) | 6 (50,0) | 2 (16,7) |
| Carc. epidermóide | 2 (33,3) | 4 (66,7) | - |
| Adenocarcinoma | 10 (25,6) | 18 (46,2) | 11 (28,2) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 2,588 (0,673) | | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

Tabela 3.23 Distribuição das frequências genotípicas de *GSTP1* em função da histologia prevalente na população, após estratificação pelo sexo e pelos hábitos tabágicos, simultaneamente.

| <i>GSTP1</i> | A/A | A/G | G/G |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------|----------|
| Sexo masculino, Fumadores | | | |
| Carc peq células | 15 (71,4) | 4 (19,1) | 2 (9,5) |
| Carc. epidermóide | 11 (39,3) | 11 (39,3) | 6 (21,4) |
| Adenocarcinoma | 4 (20,0) | 14 (70,0) | 2 (10,0) |
| $\chi^2(\text{Sig})^1$ | 13,599 (0,006) | | |
| Sexo masculino, Ex-Fumadores | | | |
| Carc peq células | 3 (37,5) | 5 (62,5) | - |
| Carc. epidermóide. | 4 (26,7) | 8 (53,3) | 3 (20,0) |
| Adenocarcinoma | 7 (46,7) | 6 (40,0) | 2 (13,3) |
| $\chi^2(\text{Sig})^1$ | 2,768 (0,644) | | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

²Não foi realizada a mesma análise aos não fumadores devido ao número reduzido de indivíduos nesta categoria.

O estudo de regressão logística apresentado na Tabela 3.24 permitiu avaliar a contribuição do genótipo de *GSTP1* para a diferenciação entre adenocarcinoma e carcinoma das pequenas células, grupos histológicos nos quais se encontrou maior disparidade na distribuição das frequências genotípicas e os quais estão associados ao consumo de tabaco (Tabelas 3.22 e 3.23). O modelo contém apenas uma variável *GSTP1*, revelando-se integralmente um modelo estatisticamente significativo ($\chi^2(2, N=122)= 7,27$; Sig= 0,026). A presença de *GSTP1* na forma de alelo raro, *GSTP1(G/G)*, envolve um risco 4,1 vezes superior ao risco induzido pela presença do genótipo “A/A”, enquanto que o genótipo em heterozigotia, *GSTP1(A/G)* representa um risco ligeiramente mais baixo, de 2,4.

Tabela 3.24 Regressão logística relativa à contribuição dos genótipos de *GSTP1* para a diferenciação entre adenocarcinoma e carcinoma das pequenas células, tipos histológicos prevalentes na população de doentes.

| Variáveis | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|------------------------|-------------------------|-------|-------|----|--------------|---------|-----------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp (B) | IC (95%) |
| <i>GSTP1</i> (A/A, wt) | | | 6,936 | 2 | 0,031 | | |
| <i>G/G</i> (mut) | 1,402 | 0,631 | 4,945 | 1 | 0,026 | 4,065 | [1,181; 13,993] |
| <i>A/G</i> (het) | 0,872 | 0,420 | 4,308 | 1 | 0,038 | 2,391 | [1,050; 5,447] |
| Constante | 0,044 | 0,298 | 0,022 | 1 | 0,882 | 1,045 | |

Uma abordagem semelhante, mas com as três associações genotípicas prevalentes, *GSTP1*(A/G)/*GSTT1*posit/*GSTM1*posit, *GSTP1*(A/A)/*GSTT1*neg/*GSTM1*posit e *GSTP1*(A/G)/*GSTT1*neg/*GSTM1*posit reforçam a associação destas com os três grupos histológicos, quando considerada apenas a subpopulação de fumadores ($\chi^2 = 8,674$, Sig = 0,048, Tabela 3.25). O reduzido número de indivíduos neste estudo impede-nos de aplicar a análise por regressão logística de forma a reforçar os resultados encontrados.

Tabela 3.25 Distribuição das frequências genotípicas prevalentes, pelos principais tipos histológicos encontrados na população de doentes, após associação dos genes das Glutationas por concatenação.

| <i>GSTP1/GSTT1/GSTM1</i> | (A/A)/neg/posit | (A/G)/posit/posit | (A/G)/neg/posit |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------|
| Fumadores | | | |
| Carc peq células | 2 (22,2) | 5 (55,6) | 2 (22,2) |
| Carc. epidermóide | 2 (10,0) | 4 (20,0) | 14 (70,0) |
| Adenocarcinoma | 5 (26,3) | 9 (47,4) | 5 (26,3) |
| | χ^2 (Sig) ¹ | 8,674 (0,048) | |
| Não Fumadores | | | |
| Carc peq células | 1(25,0) | 2 (50,0) | 1 (25,0) |
| Carc. epidermóide | - | 2 (100,0) | - |
| Adenocarcinoma | 4 (30,8) | 5 (38,4) | 4 (30,8) |
| | χ^2 (Sig) | 2,647 (0,770) | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

Para além dos resultados apresentados, foram realizados estudos de associação entre as demais variáveis clínicas consideradas neste trabalho e os genes das glutathionas, quer individualmente quer após concatenação. As variáveis clínicas consideradas foram a localização tumoral, a multifocalidade, a bilateralidade, o estadió, a sobrevivência e a metastização. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os genótipos das glutathionas e as referidas variáveis.

3.2.2.2. Enzimas N-acetil transferases

A caracterização genotípica deste gene nas duas populações, permitiu dividi-las em dois grupos fenotípicos distintos, “acetilador rápido” e “acetilador lento”. Foi ainda realizada uma análise mais alargada da distribuição destes nas duas populações e suas associações com as características quer de risco quer clínicas. Como ficou explicitado pelos resultados expostos nas Tabelas 3.4 e 3.5, os indivíduos em ambas as populações possuem maioritariamente fenótipo “acetilador lento”, com prevalência deste na população de doentes (81,0%). Foi ainda encontrada uma associação estatisticamente significativa entre este fenótipo e as populações doente e controlo, considerando os indivíduos do sexo masculino. Para a mesma população, o estudo de associação entre o fenótipo do gene *NAT2* e o sexo não revelou diferenças estatisticamente significativas (Pop. doentes: $\chi^2 = 3,009$, Sig= 0,083; Pop. Controlo: $\chi^2 = 0,077$, Sig= 0,782).

A distribuição dos dois fenótipos tendo em consideração o sexo, a história familiar, hábitos alcoólicos, hábitos tabágicos, a carga tabágica e a cessação tabágica encontram-se descritos na Tabela 3.26. A subpopulação de “acetilador lento” revela associações estatisticamente significativas com as variáveis sexo (sig=0,010), história familiar (sig=0,001), hábitos alcoólicos (sig=0,001), hábitos tabágicos (sig< 0,001) e cessação tabágica (sig< 0,001). Estes resultados parecem confirmar a prevalência desta subpopulação, uma vez que coincidem com os resultados encontrados na análise da caracterização de ambas as populações. A subpopulação de “acetilador rápido” apresenta apenas uma associação estatisticamente significativa relativa à história

familiar (sig=0,001). Apesar de esta também estar associada ao fenótipo “acetilador lento”, o valor de OR, para o “acetilador rápido” é superior.

Tabela 3.26 Distribuição dos fenótipos de NAT2 pelas características associadas a fatores de risco. Estudo de associação por aplicação do teste do χ^2 .

| Fenótipo | “acetilador rápido” | | “acetilador lento” | |
|---------------------------|---|-------------------|--|-------------------|
| | Pop. Doente (%) | Pop. Controlo (%) | Pop. Doente (%) | Pop. Controlo (%) |
| Sexo | | | | |
| Feminino | 13 (36,1) | 23 (37,7) | 34 (22,2) | 60 (35,7) |
| Masculino | 23 (63,9) | 38 (62,3) | 119 (77,8) | 108 (64,3) |
| χ^2 (Sig) OR [IC] | 0,025 (0,875) | | 7,039 (0,010) 1,94 [1,19; 3,19] | |
| História Familiar | | | | |
| Sim | 13 (38,2) | 5 (8,2) | 43 (30,3) | 13 (7,9) |
| Não | 21 (61,2) | 56 (91,8) | 99 (69,7) | 151 (92,1) |
| χ^2 (Sig) OR [IC] | 12,827 (0,001) 6,93 [2,2;21,8] | | 25,44 (<0,001) 5,05 [2,58; 9,86] | |
| Hábitos alcoólicos | | | | |
| Não | 9 (29,0) | 21 (35,6) | 50 (35,5) | 86 (54,4) |
| Sim | 22 (71,9) | 38 (64,4) | 91 (64,5) | 72 (45,6) |
| χ^2 (Sig)OR [IC] | 0,394 (0,640) | | 10,813 (0,001) 2,17 [1,36;3,46] | |
| Hábitos Tabágicos | | | | |
| Fumador | 8 (22,8) | 8 (13,1) | 69 (45,1) | 18 (10,8) |
| Não fumador | 16 (44,4) | 33 (54,1) | 49 (32,0) | 103 (61,7) |
| Ex fumador | 12 (33,3) | 20 (32,8) | 35 (22,9) | 46 (27,5) |
| χ^2 (Sig)OR [IC] | 1,558 (0,459) | | 50,06 (< 0,001) | |
| Carga Tabágica | | | | |
| <5 uma | - | 11 (3,4) | 4 (4,0) | 2 (3,2) |
| [5;20[| 3 (16,7) | 2 (6,9) | 2 (2,0) | 3 (4,1) |
| [20;50[| 15 (83,3) | 26 (89,7) | 95 (94,1) | 57 (91,9) |
| χ^2 (Sig)OR [IC] | 1,685 (0,608) | | 1,215 (0,554) | |
| Cessaçãotabágica | | | | |
| <1 ano | 8 (44,4) | 8 (27,6) | 69 (68,3) | 18 (29,5) |
| [1,15]anos | 8 (44,4) | 11 (37,9) | 21 (20,8) | 22 (36,1) |
| >15 anos | 2 (11,2) | 10 (34,5) | 11 (10,9) | 21 (34,4) |
| χ^2 (Sig)OR [IC] | 3,420 (0,181) | | 24,672 (< 0,001) | |

Os resultados obtidos por aplicação do mesmo teste, na população de doentes, relativamente às variáveis clínicas revelam associações estatisticamente significativas com a histologia do tumor (sig=0,036) e com a metastização (sig=0,039), situação

singular encontrada para esta variável clínica (Tabela 3.27). É de salientar a prevalência de indivíduos com o fenótipo “acetilador rápido” no grupo de adenocarcinoma, enquanto que nos restantes tipos histológicos considerados verifica-se a prevalência do fenótipo “acetilador lento”. Relativamente à variável “metastização”, será significativo o reduzido número de indivíduos com o fenótipo “acetilador rápido”(12,2%) no sub-grupo de doentes com metastização na altura do diagnóstico, quando comparados com os indivíduos sem metastização (24,5%). Analisando o grupo dos indivíduos com metastização, há prevalência do fenótipo “acetilador lento” (87,8%) relativamente ao fenótipo “acetilador rápido” (12,2%).

O estudo de regressão logística apresentado na Tabela 3.28 avalia a contribuição das diferentes variáveis associadas a fatores de risco, como sejam o sexo, os hábitos alcoólicos e a cessação tabágica, e o fenótipo do gene *NAT2*, para a caracterização dos doentes com cancro do pulmão. O modelo apresentado é estatisticamente significativo (χ^2 (N=190,df=5)=57,699; Sig<0,001), explicando entre 26,2% (Cox e Snell R square) e 35,1% (Nagelkerke R square) da variância observada na população de doentes, classificando corretamente 72,6% destes. O sexo e a cessação tabágica por um período superior a um ano, na altura do diagnóstico, não contribuem significativamente para o modelo apresentado. As restantes variáveis evidenciam uma contribuição significativa, verificando-se um risco 4,17 vezes superior para os hábitos alcoólicos, de 6,67 vezes para a cessação tabágica no período inferior a um ano antes do diagnóstico e um risco de 3,88 vezes o fenótipo “acetilador lento”. Estas variáveis confirmam os resultados encontrados e contribuem significativamente para a caracterização dos indivíduos com cancro do pulmão.

. Estes resultados permitem definir uma subpopulação de doentes com cancro do pulmão, como sendo indivíduos com fenótipo “acetilador lento”, maioritariamente do sexo masculino, com história familiar de cancro, com hábitos alcoólicos, sendo fumadores ou ex-fumadores, com cessação tabágica inferior a um ano. Na população controlo, os indivíduos com fenótipo “acetilador lento”, são maioritariamente homens, sem história familiar, sem hábitos alcoólicos, não fumadores e, quando ex-fumadores, a cessação tabágica ocorreu há mais de um ano.

Tabela 3.27 Distribuição dos fenótipos de NAT2 pelas características clínicas avaliadas, na população de doentes. Estudo de associação por aplicação do teste do χ^2 .

| Fenótipo | População Doente/ NAT2 | |
|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| | “acetilador rápido” (%) | “acetilador lento” (%) |
| Histologia do tumor | | |
| Carc. peq. células | 5 (11,9) | 37 (88,1) |
| Carc. Epidermoide | 5 (10,4) | 43 (89,6) |
| Adenocarcinoma | 53 (72,7) | 20 (27,3) |
| χ^2 (Sig) | 6,709 (0,036) | |
| Localização do tumor | | |
| Lobo sup, pulmão esq. e dir. | 18 (23,7) | 58 (76,3) |
| Lobo inf, pulmão esq. e dir. | 10 (24,4) | 31 (75,6) |
| χ^2 (Sig) | 0,007 (1,000) | |
| Estádio | | |
| Até IIIA | 4 (25,0) | 12 (75,0) |
| IIIB | 4 (28,6) | 10 (71,4) |
| IV | 15 (16,5) | 76 (83,5) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 1,948 (0,365) | |
| Sobrevivência | | |
| <2anos | 15 (30,0) | 35 (70,0) |
| >2anos | 4 (13,8) | 25 (86,2) |
| χ^2 (Sig) ¹ | 2,639 (0,171) | |
| Metastização | | |
| Sim | 9 (12,2) | 65 (87,8) |
| Não | 27 (24,5) | 83 (75,5) |
| χ^2 (Sig) | 4,311 (0,039) | |
| OR [I.C.] | 2,35[1,03; 5,34] | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

Tabela 3.28 Regressão logística relativa à contribuição do fenótipo de NAT2, “acetilador lento” ou “acetilador rápido”, para a diferenciação entre ser ou não doente, quando associada a outros fatores de risco, nomeadamente sexo, consumo de álcool e cessação tabágica na altura do diagnóstico.

| Variáveis | Parâmetros estatísticos | | | | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------|--------|----|--------|--------|--------------|
| | B | SE | Wald | df | Sig. | Exp(B) | IC (95%) |
| Sexo(feminino) | | | | | | | |
| Masculino | 0,904 | 0,697 | 1,681 | 1 | 0,195 | - | - |
| Consumo de álcool (Não) | | | | | | | |
| Sim | 1,429 | 0,371 | 14,846 | 1 | <0,001 | 4,176 | [2,012;8,64] |
| Cessaçãotabágica(>15anos) | | | 20,809 | 2 | <0,001 | | |
| <1 ano | 1,897 | 0,451 | 17,717 | 1 | <0,001 | 6,667 | [2,76;16,13] |
| [1;15[| 2,611 | 0,473 | 1,669 | 1 | 0,196 | - | - |
| Fenótipo NAT2 (“Rápido”) | | | | | | | |
| “Lento” | 1,356 | 0,415 | 10,651 | 1 | 0,001 | 3,881 | [1,72;8,76] |
| Constante | -3,707 | 0,880 | 17,749 | 1 | <0,001 | 0,025 | |

A Tabela 3.29 apresenta um estudo relativo à contribuição das variáveis “cessaçãotabágica” e o fenótipo do NAT2 para a presença de metástases na altura do diagnóstico. A análise foi realizada tendo em consideração o valor de significância estatística encontrado quando do estudo de associação entre os fenótipos de NAT2 e as variáveis clínicas (Metastização: sig=0,039, OR=2,35; Tabela 3.27). O modelo apresenta globalmente um valor de χ^2 estatisticamente significativo (χ^2 (N=116, df=3)= 8,166; Sig=0,043), explica entre 6,8% (Cox e Snell R square) a 9,1% (Nagelkerke R square) da variância observada na população de doentes e classifica corretamente 56,0% dos indivíduos. Apesar da cessaçãotabágica não contribuir significativamente para o risco de metastização na altura do diagnóstico, esta influencia a contribuição do fenótipo “acetilador lento”. Este revela-se estatisticamente significativo (sig=0,026), conferindo um risco cerca de 4,5 vezes superior relativamente aos indivíduos com o fenótipo “acetilador rápido”.

Não foi possível estabelecer um modelo de regressão logística, estatisticamente significativo a partir do resultado obtido nos estudos de associação, relativos à histologia do tumor (Tabela 3.27), este modelo permitiria avaliar a contribuição das diversas variáveis estudadas para esta variável clínica. Esta situação resulta do reduzido número de indivíduos presentes em cada categoria da variável histologia para “acetilador rápido”.

Tabela 3.29 Regressão logística relativa ao estudo da contribuição do fenótipo “acetilador lento” e do factor de risco “aessação tabágica” para a metastização na altura do diagnóstico.

| Variáveis | Parâmetros estatísticos | | | | | | |
|----------------------------|-------------------------|-------|-------|----|--------------|--------|--------------|
| | B | SE | Wald | df | Sig. | Exp(B) | IC (95%) |
| Cessaçã tabágica (>15anos) | | | 1,007 | 2 | 0,587 | | |
| <1 ano | 0,590 | 0,668 | 0,780 | 1 | 0,377 | - | - |
| [1;15[| 0,265 | 0,750 | 0,125 | 1 | 0,724 | - | - |
| Fenótipo NAT2 (“Rápido”) | | | | | | | |
| “Lento” | 1,498 | 0,673 | 4,952 | 1 | 0,026 | 4,471 | [1,20;16,72] |
| Constante | -2,003 | 0,879 | 5,192 | 1 | 0,023 | 0,135 | |

3.3. Estudo da contribuição das associações das enzimas da fase I e fase II para o cancro do pulmão.

As Tabelas 3.30 e 3.31 dizem respeito a estudos de regressão logística, avaliando a contribuição das diferentes variáveis estudadas como potenciais fatores de risco bem como os genótipos encontrados, por combinação, para a caracterização dos doentes com cancro do pulmão.

A Tabela 3.30 apresenta os resultados de um estudo de regressão logística em que foram avaliadas as variáveis que mais contribuem para caracterizar um indivíduo doente, com cancro do pulmão. O modelo é constituído por quatro variáveis, sexo, hábitos alcoólicos, a combinação dos genótipos das glutations GSTP1, GSTT1 e GSTM1 e o fenótipo para NAT2. O modelo global é estatisticamente significativo (χ^2 (N=123,df=6)=28,815; Sig<0,001), explicando entre 20,9% (Cox e Snell R square) a 27,9% (Nagelkerke R square) da variância observada na população de doentes e classifica corretamente 74,0% destes indivíduos.

Tabela 3.30 Regressão logística relativa à contribuição dos fenótipos de *NAT2*, “acetilador lento” e “acetilador rápido” e das associações de genótipos para GSTs, *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI(+)*, *GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* e *GSTP1(A/G)/GSTT1(+)/GSTMI(+)*, para a diferenciação entre ser ou não doente, associada a outros fatores de risco, nomeadamente sexo e hábitos alcoólicos.

| Variáveis | Parâmetros estatísticos | | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|-------|--------|----|------------------|--------|--------------|
| | B | SE | Wald | df | Sig. | Exp(B) | IC (95%) |
| Sexo(feminino) | | | | | | | |
| Masculino | 1,065 | 0,450 | 5,606 | 1 | 0,018 | 2,900 | [1,20;7,00] |
| Hábitos alcoólicos(Não) | | | | | | | |
| Sim | 0,708 | 0,436 | 2,636 | 1 | 0,104 | - | - |
| Genótipo GSTs ((A/G)/+/+) | | | 12,366 | 2 | 0,002 | | |
| <i>GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI(+)</i> | 1,696 | 0,504 | 11,338 | 1 | <0,001 | 5,452 | [2,03;14,63] |
| <i>GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)</i> | 1,184 | 0,559 | 4,489 | 1 | 0,034 | 3,268 | [1,09; 9,77] |
| Fenótipo <i>NAT2</i> (“Rápido”) | | | | | | | |
| “Lento” | 1,236 | 0,511 | 5,854 | 1 | 0,016 | 3,443 | [1,27;9,37] |
| Constante | -2,870 | 0,681 | 17,743 | 1 | <0,001 | 0,057 | |

As variáveis sexo masculino (sig=0,018), as duas combinações genótípicas, *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* (sig<0,001) e *GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* (sig=0,034) bem como o fenótipo “acetilador lento” (sig=0,016) contribuem significativamente para o “perfil de doente”, conferindo um risco aumentado de, respetivamente 2,9, 5,4, 3,3 e 3,4 vezes. A combinação genotípica *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* confere um risco 5,4 vezes superior relativamente a *GSTP1(A/G)/GSTT1(+)/GSTMI(+)* enquanto que a combinação *GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* contribui com um risco inferior, cerca de 3,3 vezes. O fenótipo “acetilador lento” apresenta para este modelo um risco, cerca de 3,4 vezes superior relativamente ao fenótipo “acetilador lento”. O sexo tem relevância estatística, sendo atribuído um risco 2,9 vezes superior a um indivíduo do sexo masculino relativamente a um indivíduo do sexo feminino.

Na Tabela 3.31, foram avaliadas não só as contribuições das variáveis de risco que mais se destacaram como significativas para “ser doente com cancro do pulmão”, tais como sexo e consumo de álcool, como também avaliámos simultaneamente a contribuição das combinações genótípicas das glutatonas, enzimas do citocromo P450 e fenótipo do *NAT2*. Este modelo apresenta-se, tal como os outros, estatisticamente significativo (χ^2 (N=72, df=6)= 20,196; Sig=0,003), explicando entre 24,5% (Cox e

Snell R square) a 32,6% (Nagelkerke R square) da variância observada na população de doentes e classificando corretamente 75,0% dos indivíduos. Apesar das variáveis sexo, hábitos alcoólicos e combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6(G/G)* não apresentarem valores de significância estatística, estes parecem interferir na contribuição das combinações *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* e *GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* bem como da contribuição do fenótipo “acetilador lento” para a caracterização do indivíduo doente.

Tabela 3.31 Regressão logística relativa à contribuição do fenótipo de *NAT2* e das associações de genótipos para GSTs e CYPs, respectivamente *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTT1(+)*, *GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* e *GSTP1(A/G)/GSTT1(+)/GSTMI(+)* e *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6(G/A)* e *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6(G/G)*, para a diferenciação entre ser ou não doente, associada a outros fatores de risco, nomeadamente sexo e hábitos alcoólicos.

| Variáveis | Parâmetros estatísticos | | | | | | |
|---|-------------------------|-------|--------|----|--------------|--------|--------------|
| | B | SE | Wald | df | Sig. | Exp(B) | IC (95%) |
| Sexo (feminino) | | | | | | | |
| Masculino | 0,676 | 0,662 | 1,043 | 1 | 0,307 | - | - |
| Hábitos alcoólicos (Não) | | | | | | | |
| Sim | 1,091 | 0,633 | 2,971 | 1 | 0,085 | - | - |
| Genótipo GST | | | 9,554 | 2 | 0,008 | | |
| (<i>GSTP1(A/G)/GSTT1(+)/GSTMI(+)</i>) | | | | | | | |
| <i>GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI(+)</i> | 1,930 | 0,699 | 7,614 | 1 | 0,006 | 6,889 | [1,75;27,12] |
| <i>GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)</i> | 1,814 | 0,792 | 5,237 | 1 | 0,022 | 6,132 | [1,30;28,98] |
| Genótipo CYP | | | | | | | |
| (<i>1A1*2A(T/T)/1A1*2C(A/A)/2D6(G/A)</i>) | | | | | | | |
| <i>CYP1A1(T/T)/CYP1A1*2C(A/A)/CYP2D6(G/G)</i> | 0,198 | 0,588 | 0,113 | 1 | 0,736 | - | - |
| Fenótipo <i>NAT2</i> (“Rápido”) | | | | | | | |
| “Lento” | 1,388 | 0,653 | 4,521 | 1 | 0,033 | 4,007 | [1,12;14,48] |
| Constante | -3,049 | 0,952 | 10,265 | 1 | 0,001 | 0,047 | |

Assim, neste modelo, a combinação *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* confere um risco cerca de 6,9 vezes superior e a combinação *GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI(+)* um risco 6,1 vezes superior relativamente à combinação *GSTP1(A/G)/GSTT1(+)/GSTMI(+)*. Por outro lado, ser um “acetilador lento” confere um risco 4,0 vezes superior relativamente a ser um “acetilador rápido”. Estes valores de risco são superiores aos verificados para os mesmos estudos de regressão logística, considerando as mesmas variáveis mas excluindo as combinações das enzimas do citocromo P450, CYPs (Tabela 3.31).

3.4 Estudo de associação entre CYPs, GSTs e a proteína mutada TP53.

Na Tabela 3.32 são apresentadas as frequências encontradas relativas à presença da proteína TP53 mutada (com marcação) ou não mutada (sem marcação) em função do sexo. Este estudo não revela uma associação estatisticamente significativa entre as duas variáveis analisadas ($\chi^2(N=116)=1,490$; sig=0,271).

Tabela 3.32 Distribuição das frequências encontradas para a proteína do gene supressor tumoral *TP53* em função do sexo da população de doentes. Detecção realizada por imunohistoquímica, para deteção da proteína mutada, em biópsias e peças cirúrgicas de tecido tumoral do pulmão parafinado.

| Pop. Doentes | Sexo feminino | Sexo masculino | χ^2 (Sig) |
|--------------|---------------|----------------|----------------|
| TP53 mutada | | | |
| Sem marcação | 21(28,8) | 52(71,2) | 1,490 (0,271) |
| Com marcação | 8(18,6) | 35(81,4) | |

O estudo de regressão logística apresentado na Tabela 3.33, permite avaliar a contribuição da localização tumoral para os diferentes valores de marcação da proteína mutada TP53. O modelo contém apenas uma variável independente, a localização tumoral, revelando-se, na globalidade, um modelo estatisticamente significativo ($(X^2(df=2,N=73)=6,568/Sig=0,010)$), permitindo associar a marcação de TP53 com a localização tumoral.

Tabela 3.33 Regressão logística relativa a uma possível associação entre a localização do tumor com os níveis de marcação (>50%) da proteína mutada TP53 (variável dependente: TP53 mutado, com marcação para valores >50%).

| Características | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|------------------------------------|-------------------------|-------|-------|----|--------------|---------|----------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp (B) | IC (95%) |
| Associação | | | | | | | |
| (Lobo inf, pulmão esq e direito) | | | | | | | |
| Lobo sup., pulmão esq e direito | 1,166 | 0,549 | 4,509 | 1 | 0,034 | 3,208 | [1,094; 9,410] |
| Constante | -1,299 | 0,461 | 7,958 | 1 | 0,005 | 0,273 | |

Globalmente, o modelo explica entre 8,6% (Cox and Snell R square) a 13,20% (Nagelkerke R square) da variância observada na marcação de TP53, e classifica correctamente 78,1% dos casos analisados. A localização do tumor no lobo superior de ambos os pulmões revela uma contribuição estatisticamente significativa para a marcação de TP53 (TP53 mutada), com um risco 3,2 vezes superior relativamente ao lobo inferior.

Após combinação, por concatenação, dos genes *CYP1A1*2A/*2C/CYP2D6*4* e da proteína mutada TP53 foram realizados estudos de associação entre as combinações prevalentes obtidas e as variáveis de risco e clínicas já referidas. O reduzido número de doentes impediu uma abordagem fiável destas combinações na população, pelo que se omitem as Tabelas relativas ao estudo. A estratificação pelo sexo permitiu verificar o reduzido número de indivíduos do sexo feminino relativamente ao sexo masculino. A presença de zeros nas células conduz a um valor do teste do χ^2 de significância estatística pouco credíveis, apesar das análises terem sido realizadas por aplicação do teste exacto de Fisher. Os estudos de associação entre estas combinações e as variáveis de risco não revelam valores estatisticamente significativos (Antecedentes familiares: $\chi^2(N=49; sig=0,052)=4,952$; Consumo de álcool: $\chi^2(N=48; sig=0,097)=2,648$; Hábitos tabágicos: $\chi^2(N=54; sig=0,243)=1,034$; Cessação tabágica: $\chi^2(N=35; sig=0,633)=1,342$; Carga tabágica: $\chi^2(N=32; sig=0,678)=1,556$) bem como com as variáveis clínicas

(Histologia: $\chi^2(N=63; \text{sig}=0,705)=3,975$; Localização do tumor: $\chi^2(N=53; \text{sig}=0,341)=3,656$; Estadio: $\chi^2(N=42; \text{sig}=0,061)=9,571$; Sobrevida: $\chi^2(N=25; \text{sig}=0,537)=2,525$).

Após combinação dos genes de fase II e os valores de marcação da proteína mutada, TP53, obtidos por imunohistoquímica, verificou-se que apenas a combinação do gene *GSTP1* com TP53 mutada, apresenta valores de associação estatisticamente significativos ($\text{sig}<0,05$) com as diferentes variáveis, quer sejam as de risco quer sejam as clínicas. A Tabela 3.34 apresenta as diferentes frequências obtidas, após concatenação entre *GSTP1* e TP53 mutada, na população de doentes e após estratificação pelo sexo, revelando ausência de significância estatística ($\text{sig}=0,331$).

Tabela 3.34 Distribuição das frequências relativas à associação, por concatenação, do genótipo de *GSTP1* e o resultado da marcação, por imunohistoquímica, de tecido pulmonar neoplásico para detecção da proteína mutada de TP53.

| | Pop Doentes (%) | Sexo masculino | Sexo feminino |
|----------------------------|-----------------|-------------------------|---------------|
| <i>GSTP1</i> (A/A)/ TP53 - | 29 (25,2) | 23 (26,7) | 6 (20,7) |
| <i>GSTP1</i> (A/A)/ TP53+ | 13 (11,3) | 10 (11,6) | 3 (10,4) |
| <i>GSTP1</i> (A/G)/ TP53 - | 43 (37,4) | 28 (32,6) | 15(51,7) |
| <i>GSTP1</i> (A/G)/ TP53 + | 30 (26,1) | 25 (29,1) | 5 (17,2) |
| | | $\chi^2 (\text{sig})^1$ | 3,427 (0,331) |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

Relativamente à distribuição das mesmas combinações pelas categorias da variável localização tumoral verificamos a prevalência da combinação para *GSTP1* em heterozigotia (A/G + G/G) e TP53 mutada no lobo superior dos pulmões (36,4%). Esta distribuição revela-se estatisticamente significativa (Tabela 3.35; $\text{sig}=0,022$).

Tabela 3.35 Estudo de associação entre as combinações de genótipos, obtidas por concatenação, entre *GSTPI* e o padrão de TP53 mutado obtido por imunohistoquímica, e a localização tumoral.

| Localização | <i>GSTPI</i> (A/A)/ TP53 – (%) | <i>GSTPI</i> (A/A)/ TP53+ (%) | <i>GSTPI</i> (A/G)/ TP53– (%) | <i>GSTPI</i> (A/G)/TP53+ (%) |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Pulmão esq. e direito, lobo sup | 12 (27,2) | 5 (11,4) | 11 (25,0) ² | 16 (36,4) ² |
| Pulmão esq. e direito, lobo inf | 5 (17,9) | 2 (7,1) | 17 (60,7) ² | 4 (14,3) ² |
| χ^2 (Sig) ¹ | 9,224 (0,022) | | | |

¹Aplicação do Teste Exacto de Fisher

²Células cujos valores dos resíduos ajustados indicam serem as associações que mais contribuem para o valor de χ^2 .

O estudo de regressão logística relativa à contribuição das combinações *GSTPI*/TP53 para a localização tumoral, lobo superior ou inferior, do pulmão esquerdo e direito, está descrito na Tabela 3.36.

Tabela 3.36 Regressão logística relativa à contribuição da associação *GSTPI*/TP53 mut para a localização “preferencial” do tumor, no lobo superior, de ambos os pulmões.

| Características | Parâmetros Estatísticos | | | | | | |
|--|-------------------------|-------|-------|----|--------------|---------|---------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig | Exp (B) | IC (95%) |
| Associação (<i>GSTPI</i> (A/A)/ TP53-) | | | 8,950 | 2 | 0,11 | | |
| <i>GSTPI</i> (A/G)/ TP53+ | 1,822 | 0,680 | 7,179 | 1 | 0,007 | 6,181 | [1,63; 23,4] |
| <i>GSTPI</i> (A/G)/ TP53- | 1,323 | 0,593 | 4,978 | 1 | 0,026 | 3,753 | [1,17; 11,95] |
| Constante | -0,435 | 0,387 | 1,266 | 1 | 0,261 | 0,647 | |

O modelo apresenta-se integralmente como um modelo estatisticamente significativo ((X^2 (df=2,N=72)=9,717/Sig=0,008) permitindo associar a distribuição de *GSTPI*/TP53 com a localização tumoral. Globalmente, o modelo explica entre 12,6% (Cox and Snell R square) a 17,1% (Nagelkerke R square) da variância observada na

marcação de TP53, e classifica corretamente 69,4% dos casos analisados. A combinação *GSTP1(A/G)/TP53+* contribui significativamente (sig=0,007) para o padrão de localização tumoral, verificando-se uma preferência para o lobo superior, pulmão esquerdo e/ou direito, associado a um risco de 6,2 relativamente à combinação *GSTP1(A/A)/TP53-*. De igual modo, embora revelando um risco inferior, 3,8, *GSTP1(A/G)/TP53-* contribui de forma estatisticamente significativa para o padrão de distribuição tumoral (sig=0,026).

Capítulo IV

DISCUSSÃO

4. Discussão

4.1. Caracterização da população

A neoplasia do pulmão é a principal causa de morte por cancro no mundo sendo mesmo superior às mortes causadas pelos carcinomas colorrectal, da mama e do estomago [Ferlay J. *et al.*, 2013]. Apesar de ser uma doença rara no início do século XX, hoje é um dos tumores malignos mais frequente e mortífero.

Ao nível da UE, Portugal possui uma das mais baixas taxas de incidência padronizada de tumores malignos da traqueia, brônquios e pulmão, 23,60, relativamente aos restantes estados membros [Registo Oncológico Nacional (RON) 2007-RORENO 2013]. Considerando Portugal Continental, os registos oncológicos das três principais regiões do país revelam que, em 2009, a região Centro possuía a menor taxa de incidência padronizada anual por 100000 habitantes por grupo etário, 12,8, seguida da região Norte com 21,4 e por último a região Sul com 22,1 [Registo Roreno, 2009]. Quando avaliada por sexo, a região Centro mantinha os menores valores da taxa de incidência padronizada anual (por 100000 por grupo etário por sexo). À data da realização deste estudo, 2003 a 2006, a taxa de incidência dos tumores malignos da traqueia, brônquios e pulmão eram, para o sexo masculino, de 39,7 na região norte, de 23,2 na região centro e de 40,7, na região sul enquanto que no sexo feminino os valores apresentavam-se bastante inferiores, respetivamente, 6,7, 3,9 e 7,2 [RORENO, RORCentro, RON 2006].

Segundo o RON 2013, o número de doentes oncológicos em Portugal tem vindo a aumentar, sendo que em 2011 este valor foi 11,6% superior ao de 2007 e 2,9% superior ao de 2010. Tendo em consideração os doentes oncológicos, os doentes com tumores do pulmão registam um aumento progressivo no nosso país, referido como um “preocupante aumento registado para o sexo feminino” [RORENO 2013].

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), a evolução demográfica e a exposição a fatores de risco determinará o aumento da incidência de doenças oncológicas nos próximos anos. Importa investir na prevenção, por diminuição da exposição a fatores de risco ambientais, bem como na deteção precoce da doença. Os fatores ambientais compreendem os hábitos de risco, tais como o consumo de tabaco ou mesmo o consumo de álcool e os agentes cancerígenos ambientais ou profissionais. Importa ainda ter em consideração a predisposição genética individual, que em associação com os fatores ambientais, modula a resposta de cada indivíduo à sua exposição.

Reconhecendo que na região centro do nosso país não há, aparentemente, exposições ambientais que nos facultem uma justificação plausível para a taxa de incidência de cancro registada bem como o seu crescimento e, embora sendo uma das menores relativamente às quatro principais cidades do país, Porto, Coimbra, Lisboa e Faro, importa avaliar esta população, caracterizando o seu comportamento ao nível dos fatores comportamentais definidos como de risco bem como relativamente aos fatores moduladores da suscetibilidade, definidos geneticamente e responsáveis pela variabilidade individual na resposta a xenobióticos e outros compostos, quer exógenos quer endógenos.

Tendo em consideração que o consumo de tabaco é um fator comum, quando estabelecemos uma comparação entre as três principais regiões urbanas de Portugal continental, haverá outros fatores que nos permitam compreender a disparidade de valores encontrados para as taxas de incidência nestas regiões. Não foi, no entanto, esse, o propósito deste estudo, pelo que a investigação se focou na caracterização da população da Zona Centro do País, de forma a perceber quais os fatores que poderiam prevalecer na determinação do desenvolvimento desta doença e contribuir para a caracterização do doente com cancro do pulm.

Assim, o estudo começa por avaliar duas populações da Região Centro do País, uma a quem foi diagnosticado cancro do pulmão e a outra, sem diagnóstico de cancro, as quais deram entrada no mesmo serviço de Pneumologia, no período de 2003 a 2006. Dada a impossibilidade de proceder à colheita de sangue e execução do inquérito fora do contexto hospitalar, a população controlo foi obtida dentro do mesmo serviço de

Pneumologia embora tal escolha, pudesse introduzir, um enviesamento de Berkson ou enviesamento hospitalar, nos resultados.

4.1.1. Caracterização das populações controlo e de doentes

O aumento das taxas de incidência e de mortalidade por cancro do pulmão está intimamente associado a um aumento do consumo de tabaco. Esta associação foi demonstrada, inequivocamente, em 1950 por Doll e Hill, conduzindo desde então a diversos estudos epidemiológicos no sentido de definir as características populacionais, comportamentos de risco ou exposições ambientais, que permitissem contribuir de alguma forma para a prevenção e controlo desta doença [Doll *et al.*, 1950; Hecht, 2003; Alberg *et al.*, 2003; Parente *et al.*, 2007].

As populações estudadas diferem em diversas características analisadas, evidenciando hábitos de risco presentes na população de doentes que não se encontram em prevalência na população controlo.

Uma análise global das populações permite definir a população de doentes como mais jovem do que a controlo, com uma média de idades de 63,06 anos (\bar{x} população controlo:70,92anos), com prevalência para os intervalos etários entre os 36 anos e os 66 anos. Destes, 74,5% pertenciam ao sexo masculino e 25,5% ao sexo feminino (população controlo: 63,2% sexo masculino/36,8% sexo feminino). Da totalidade de indivíduos doentes com hábitos tabágicos, 40,0% eram fumadores e 25,5% ex-fumadores enquanto que na população controlo apenas 11,0 % eram fumadores e 28,6% foram identificados como ex-fumadores (Tabela B1, Anexo B).

A análise das populações em função do sexo, permite afirmar que a população de doentes era constituída por 50,3% de fumadores ativos, do sexo masculino, e 9,8% indivíduos fumadores ativos, do sexo feminino. A população controlo era constituída por 14,3% fumadores ativos, do sexo masculino, e 5,5% do sexo feminino. O período de

cessação tabágica revelou-se uma característica importante, evidenciando uma distribuição estatisticamente significativa entre populações. Na população de doentes, prevalece o período de cessação inferior a um ano antes do diagnóstico. Estes indivíduos evidenciaram uma prevalência para a presença de antecedentes familiares do 1º grau com algum tipo de cancro (OR= 5,34), mesmo quando avaliado apenas o grupo de indivíduos não fumadores (OR= 3,7) e após estratificação pelo sexo (sexo feminino: OR= 3,92) (Anexo B). O consumo de álcool revelou uma associação estatisticamente significativa entre populações, com prevalência para os doentes (65,9%, OR= 1,9). A associação do consumo de álcool com os hábitos tabágicos demonstrou potenciar o risco para a doença (OR= 4,5). Características como carga tabágica e tempo de consumo não demonstraram associações estatisticamente significativas com a população de doentes, por aplicação do teste do χ^2 , nem mesmo após estratificação da população pelos intervalos etários. Esta ausência de significância estatística indicia uma uniformidade na distribuição das populações pelas categorias das variáveis o qual foi comprovado pela aplicação do teste de aderência do χ^2 . Assim, indivíduos doentes e controlo possuem o mesmo tempo de consumo e, apesar da prevalência de doentes para cargas tabágicas superiores a 50 uma, este valor não é significativo numa análise em que esta variável poderia ser tratada como variável de risco.

Os intervalos etários de maior prevalência para a população de doentes estão de acordo com os descritos por diversos autores em trabalhos de epidemiologia do cancro do pulmão. Destes salienta-se um trabalho publicado em 2007 por Bárbara Parente *et al.*, relativo a um estudo realizado na população hospitalar portuguesa com cancro do pulmão, o qual apresenta uma população com uma média de idades de $64,49 \pm 11,28$ [Parente *et al.*, 2007]. Ainda neste estudo, os valores referidos para a percentagem de indivíduos do sexo masculino e feminino são muito semelhantes aos obtidos no presente trabalho, demonstrando uma prevalência do sexo masculino, a qual não deverá deixar de estar associada ao consumo de tabaco.

A distribuição de frequências encontradas para os hábitos tabágicos, entre as populações de doentes e controlo, são reveladoras de uma forte associação entre o consumo de tabaco e o cancro de pulmão, confirmando diversos estudos epidemiológicos publicados [Alberg *et al.*, 2006; Parente *et al.*, 2007; Ferlay *et al.*, 2013].

Embora seja evidente o crescente aumento do consumo de tabaco por parte do sexo feminino, o qual é descrito e comprovado por Ferlay *et al.* (2013), num estudo relativo às taxas de incidência e mortalidade de 25 tipos de cancro, em 40 países da EU, a população avaliada apresenta, ainda, um valor bastante inferior. Este valor poderá refletir os hábitos culturais no nosso país, uma vez que o consumo de tabaco, nas mulheres, não era um hábito prevalente até há 20 ou 30 anos atrás. Apoiando esta ideia está o facto de a população provir maioritariamente do meio rural, cerca de 74,9% dos indivíduos doentes.

Considerado como o fator etiológico do cancro do pulmão mais relevante, o tabaco contém mais de 60 carcinogénios conhecidos, quer sejam hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) ou nitrosaminas. O fumo do tabaco produz também uma grande quantidade de radicais livres de oxigénio (ROS-“Radicals Oxygen Species”) os quais podem causar oxidação das bases nitrogenadas da molécula de ADN originando transições G para T e outras mutações. Adicionalmente, a nicotina interfere com a apoptose inibindo-a, podendo actuar como promotor tumoral nas células epiteliais do pulmão [Mackinon *et al.*, 2010]. Para além dos carcinogénios presentes no fumo do tabaco, foram identificados pelo menos 16 carcinogénios presentes no tabaco sem queima, resultantes do processamento e cura. Entre estes, estão algumas nitrosaminas específicas tais como 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) e a N'-nitrosonornicotina (NNN), bem como alguns HPA, do qual é exemplo o benzo(a)pireno (BaP) e a amina aromática 4-aminobifenil [Hecht SS *et al.*, 2003]. Estes carcinogénios, os carcinogénios resultantes da queima do tabaco, bem como as suas formas metabolicamente activadas induzem mutações através da formação de aductos na molécula de ADN. Os aductos estão associados com a ruptura de pontos de controlo do ciclo celular, instabilidade génica e outras modificações, resultando em alterações crónicas na molécula de ADN. Estas originam alterações genéticas múltiplas que são observadas no cancro de pulmão, à medida que as alterações celulares observadas “evoluem”, progressivamente, da hiperplasia para a displasia e carcinoma *in situ*, culminando no cancro invasivo [Hecht, 2003; DeMarini, 2004].

Um fumador possui um risco 20 vezes superior de desenvolver cancro do pulmão, comparativamente com um não fumador. São reduzidos os fatores de exposição ambiental que produzem um nível de risco tão elevado. Este risco está intrinsecamente

associado com o padrão de consumo, avaliado em relação à frequência de consumo e profundidade de inalação, tempo de consumo e carga tabágica [Alberg *et al.*, 2003].

O risco aumenta com o tempo de consumo e o número de cigarros fumados por dia. No entanto, diversos estudos revelaram que o efeito de um tempo de consumo elevado é mais prejudicial do que a quantidade de cigarros consumidos por dia [Peto, 1998; Flanders *et al.*, 2003]. Assim, segundo o modelo proposto por Doll e Peto, enquanto um consumo triplo de cigarros fumados num dia conduz a um risco triplo em desenvolver cancro do pulmão, um período de consumo triplo conduzirá a um aumento do risco em 100 vezes. Este efeito tem consequências graves para os indivíduos que iniciam a prática de consumo em idades jovens uma vez que o efeito exponencial da duração do consumo aumenta drasticamente o risco de desenvolver cancro do pulmão durante a sua vida [Alberg *et al.*, 2003]. A prevalência de indivíduos do sexo masculino, fumadores, nas faixas etárias mais baixas poderá refletir a reduzida taxa de sobrevivência do cancro do pulmão, em que menos de 10% dos indivíduos diagnosticados estarão vivos, num período de cinco anos após o diagnóstico [Uehara *et al.*, 1998].

O período de cessação tabágica está associado ao risco de desenvolver cancro do pulmão. É do senso comum que qualquer fumador beneficia em deixar de fumar, reduzindo significativamente o risco de desenvolver esta doença. No entanto, mesmo para períodos de abstinência de mais de 40 anos o risco é superior, relativamente a um não fumador [Hrubec *et al.*, 2010]. Segundo estudos realizados nos Estados Unidos, parece existir também uma dependência do tempo de consumo associado a esta característica. Para um dado período de abstinência, a diminuição do risco aumenta com a diminuição do tempo de consumo, apesar dos resultados estarem dependentes do sexo, do tipo de tabaco consumido e do tipo histológico do cancro de pulmão [Alberg *et al.*, 2003]. Segundo Wu e Sin (2011), o risco de cancro de pulmão diminui lentamente logo após cessação. Após um período de 10 anos de cessação, o risco de desenvolver cancro do pulmão reduz-se entre 30% a 50% relativamente a um fumador. No entanto, um ex-fumador poderá nunca atingir o mesmo nível de risco de um não fumador. Ainda segundo estes autores, após alguns anos a taxa de declínio funcional do pulmão de um ex-fumador equipara-se ao declínio observado no pulmão de um não fumador.

Uma revisão de estudos de meta-análise envolvendo fumadores, a quem foi diagnosticado cancro do pulmão em estádios precoces da doença, evidencia a importância da cessação tabágica mesmo após o diagnóstico. Segundo esta análise, a cessação nestas situações melhora o prognóstico, com resultados surpreendentes relativamente às taxas de mortalidade, evidenciando uma redução na progressão do tumor, com consequente aumento das taxas de sobrevivência [Wu *et al.*, 2011].

O período de cessação tabágica foi avaliado nas duas populações envolvidas neste estudo. Esta variável foi categorizada em função do tempo referido como necessário para a recuperação do epitélio pulmonar relativamente à sua permeabilidade e funcionalidade [Bertram *et al.*, 1981; IARC, 2009]. A avaliação do período de cessação tabágica revelou uma associação estatisticamente significativa, verificando-se uma prevalência da população de doentes para um período de cessação inferior a um ano relativamente à altura do diagnóstico. Este resultado parece evidenciar uma associação entre a presença de sintomatologia, a consulta a um especialista de saúde e a consequente cessação do consumo, num período de tempo relativamente pequeno até ao diagnóstico.

Apesar deste envolvimento do consumo do tabaco, cerca de 80% a 90% dos casos de cancro do pulmão, é aceite que a génese desta doença é multifatorial. A exposição ambiental e ocupacional a um elevado número de agentes físicos e químicos, os quais atuam de forma sinérgica ou por interação, tem sido referida para explicar o aumento da taxa de incidência desta doença. O gás radão, por exemplo, é atualmente considerado como um fator de risco ocupacional. A Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC) da OMS, reclassificou, em 2009, uma série de compostos químicos em função da sua capacidade como “carcinogénios para os humanos” (Grupo 1). Nestes, foram incluídos as aminas aromáticas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), a dioxina (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina, TCDD) bem como os processos industriais a eles associados [Korte *et al.*, 2002]. O Grupo 2 foi constituído pelos carcinogénios prováveis ou possíveis para os humanos, estando incluídas as poeiras com sílica e asbestos. A definição de profissão de risco está associada à possibilidade de inalação ou não de compostos cancerígenos e poeiras, capazes de iniciar o processo da carcinogénese. As populações foram avaliadas quanto à prevalência de fatores de risco ocupacionais conduzindo às profissões de risco. A

população controlo foi classificada com maior número de profissões de risco não sendo prevalente qualquer profissão na população de doentes.

A associação entre consumo de álcool e a suscetibilidade para o cancro do pulmão é um tema que permanece controverso. Um estudo de meta-análise evidencia uma associação entre o álcool e o cancro do pulmão mas apenas para consumos elevados [Benedetti *et al.*, 2006]. Tem sido referido o efeito modificador de covariáveis tais como sexo, hábitos tabágicos e dieta. Benedetti *et al.*, (2006) identifica o sexo como uma variável importante na avaliação do efeito do álcool bem como o tipo de bebida que é consumida. Segundo este autor, o consumo diário de bebidas, nomeadamente cerveja, confere ao sexo masculino um maior risco de desenvolver cancro do pulmão, enquanto que o consumo de vinho parece ter um efeito protetor. Nas mulheres, o consumo moderado de álcool parece ter um efeito protetor relativamente às não consumidoras, embora o consumo intenso possa diminuir esse efeito, aumentando o risco.

O mecanismo biológico pelo qual o álcool exerce a sua ação prejudicial não é bem conhecido nem mesmo a forma como afeta o risco para os diferentes tipos histológicos do cancro do pulmão [Freudenheim *et al.*, 2005]. Foi testado em animais, o efeito carcinogénico do acetaldeído, composto resultante do metabolismo oxidativo de um álcool primário. Um estudo demonstrou uma possível associação entre a alteração dos lípidos presentes nos pulmões, bem como dos níveis de enzimas capazes de ativar os procarcinogénios e substâncias mutagénicas, com o consumo de álcool. Foi referido que esta ação resultaria do efeito oxidativo deste composto orgânico [Janssen-Heijnen *et al.*, 2003].

É já aceite que o consumo diário de vegetais e frutas frescas é benéfico, podendo actuar sinergicamente com o efeito protetor do álcool, no caso do consumo de vinho, ou reduzir o seu efeito prejudicial no caso, por exemplo, do consumo da cerveja [Freudenheim *et al.*, 2005]. Apesar de não ter sido possível discriminar o tipo de álcool consumido pelos indivíduos das duas populações, a presença de um menor número de “não consumidores” na população de doentes parece evidenciar o efeito protetor desta característica. Será importante ter em consideração o facto da população portuguesa possuir hábitos de consumo de vinho tinto às refeições, o que corrobora o estudo de Benedetti relativamente ao efeito anti-oxidante de compostos polifenóis. Esta situação

resultou num maior risco para a população de doentes (OR= 1,9). A associação do consumo de álcool com o fumo do tabaco parece exercer efeitos nefastos na população estudada, tal como descrito, uma vez que o risco é aumentado para 4,5 vezes.

Assim, o risco para desenvolver cancro do pulmão refletirá as consequências de uma associação entre a exposição a fatores etiológicos e a suscetibilidade individual a diversos agentes. Apesar dos seus efeitos nefastos, estas associações podem originar cancro do pulmão num número consideravelmente reduzido de pessoas, se tivermos em consideração a sua taxa de incidência anual [Alberg *et al.*, 2006]. Assim sendo, a característica “história familiar”, associada a um aumento da suscetibilidade individual, foi utilizado em diversos estudos epidemiológicos. Este aumento de suscetibilidade, em função do património genético herdado, está presente na população estudada, na qual 31,2% da população de doentes confirmou a presença de um familiar em primeiro grau, a quem foi diagnosticado alguma forma de cancro (OR= 5,34). Excluindo os indivíduos cujo contacto com o fumo do tabaco poderia enviesar o resultado, ou seja, considerando apenas os não fumadores, verificámos que a existência de antecedentes familiares está associada a um aumento da suscetibilidade para esta doença (OR=3,92) (Anexo B).

Ainda que diversos fatores ambientais tenham sido identificados como causadores de cancro do pulmão, existe, no entanto, uma grande variação individual na suscetibilidade aos diversos carcinogénios que podem ser inalados. O risco para desenvolver esta doença está intimamente associado à inter-relação entre a exposição a agentes etiológicos e a suscetibilidade individual a esses mesmos agentes.

4.1.2. Caracterização clínica da população de doentes

Relativamente às características clínicas avaliadas importa referir aquelas que evidenciam alguma associação com a exposição a agentes etiológicos.

A população de doentes apresentou-se, na altura do diagnóstico, sem prevalência para a bilateralidade, a multifocalidade ou a metastização. Histologicamente, o adenocarcinoma foi o tipo histológico prevalente, mesmo considerando a análise por

sexo, seguido do carcinoma epidermóide e do carcinoma das pequenas células. Relativamente à localização tumoral, esta revelou-se prevalente para o lobo superior, quer do pulmão esquerdo quer do pulmão direito. Os indivíduos apresentaram-se, na altura do diagnóstico, maioritariamente em estadio IV. O estudo da sobrevivência revelou prevalência abaixo dos dois anos após o diagnóstico.

Esta descrição da população de doentes coincide com as diversas descrições encontradas em estudos epidemiológicos realizados [Byers *et al.*, 1984; Tyczynski *et al.*, 2003; Parente *et al.*, 2007].

Os quatro tipos histológicos principais do cancro do pulmão são o carcinoma das células escamosas, o adenocarcinoma, o carcinoma de células grandes e o carcinoma de células pequenas. Os mecanismos através dos quais eles têm origem não estão estabelecidos mas sabe-se que o fumo do tabaco está associado aos principais tipos histológicos, evidenciando um efeito de dose associado ao número de cigarros consumidos [Alberg *et al.*, 2006].

A prevalência do adenocarcinoma na população de doentes (42,4%) está de acordo com o descrito relativamente a uma alteração do padrão histológico, consequência provável da alteração das características do cigarro, conduzindo a alterações nas doses de carcinogénios inaladas [Hecht, 2003]. Por outro lado, a prevalência do carcinoma epidermóide (32,4%) e do carcinoma de pequenas células (23,9) nos indivíduos do sexo masculino evidencia a presença inequívoca de hábitos tabágicos, não sendo evidente para o sexo feminino, com apenas 8,2% desta população com carcinoma epidermoide.

Segundo Hecht (2003), a alteração da prevalência histológica do carcinoma de células escamosas e do carcinoma de pequenas células para o adenocarcinoma parece refletir a alteração da composição do tabaco, evidenciando a presença de NNK (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona). O NNK é um carcinogénio pulmonar sistémico que induz, predominantemente, adenomas e adenocarcinomas em ratos, independentemente do modo de administração. As concentrações deste composto no fumo do tabaco aumentaram, no período de 1959 a 1997, devido à utilização de misturas de tabaco com níveis mais elevados de tabaco tratado [Hecht SS, 2003]. Maiores concentrações de nitrato conduzem a um aumento da combustão do tabaco, a

uma diminuição dos HPA com um conseqüente aumento na produção de óxidos de azoto os quais contribuem para a formação de nitrosaminas específicas do tabaco, NNK entre outras [Hecht, 2003; Alberg *et al.*, 2006].

As manifestações clínicas do cancro do pulmão surgem em fases tardias da evolução da doença, quando o estadio é avançado. A prevalência de um estadio avançado na altura do diagnóstico, 75,4% de doentes no estadio IV na população estudada, pode ser justificado, segundo diversos autores, pelo fato do cancro do pulmão ser “uma doença clinicamente silenciosa” [Tyczynski *et al.*, 1984; Parente *et al.*, 2007]. Estima-se que cerca de 25% dos doentes se apresentem assintomáticos na altura do diagnóstico [Alberg *et al.*, 2006].

A localização tumoral preferencial no lobo superior dos pulmões esquerdo ou direito encontrada neste estudo, 65,0% dos doentes, já foi referida por diversos autores, embora sem uma explicação concreta [Lee *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006]. Este padrão de localização parece refletir, segundo alguns estudos, a exposição a carcinogénios do fumo do tabaco, bem como uma maior oxigenação dos lobos superiores consequência da própria anatomia do pulmão. Os tumores que se desenvolvem sob influência do consumo do tabaco apresentam uma razão (lobo superior/lobo inferior) na proporção 2,5:1,0 [Zhang *et al.*, 2006].

A prevalência de uma sobrevivência inferior a dois anos (63,4%) é corroborada pelas elevadas taxas de mortalidade apresentadas em diversos estudos, como seja o de Ferlay, referindo esta doença como a causa mais comum de morte por cancro [Ferlay *et al.*, 2008].

4.2. Enzimas da fase I e II

O pulmão é um dos principais locais de acção das enzimas da fase I e II do metabolismo de xenobióticos dos quais os carcinogénios inalados, provenientes do fumo do tabaco, são os seus principais substratos [Fong *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2006].

Três “super-famílias” enzimáticas, das fases I e II do metabolismo, respetivamente citocromo P450, glutatona S-transferases e N-acetiltransferases, têm

sido estudadas relativamente à sua importância na suscetibilidade ao cancro do pulmão. [Nakachi *et al.*, 1998, Song *et al.*, 2001, Sreeja *et al.*, 2005]. Estes genes polimórficos parecem estar associados a um aumento da suscetibilidade para este cancro devido à sua participação nas reações de desintoxicação de xenobióticos e outros compostos químicos ambientais.

A variação polimórfica na actividade destas enzimas terá repercussões no metabolismo dos carcinogénios do tabaco, com consequências para o risco individual, dependente do efeito cumulativo da exposição ao fumo e do sinergismo resultante de outras exposições ambientais e ocupacionais. Assim, os polimorfismos destes genes podem estar subjacentes nas predisposições herdadas, associadas a uma suscetibilidade individual para esta doença [Gresner *et al.*, 2007].

Apesar de ter sido demonstrada, em diversos estudos, a associação destes polimorfismos com a suscetibilidade para o cancro, a funcionalidade das enzimas bem como o verdadeiro papel destes polimorfismos na variabilidade da resposta do indivíduo às agressões externas, são temas ainda hoje, envoltos em controvérsia com estudos apresentando resultados contraditórios [Nebert, 1997; Song *et al.*, 2001; Spivack *et al.*, 2003].

4.2.1. O citocromo P450- os genes *CYP1A1* e *CYP2D6*

O citocromo P450 é um sistema multienzimático, constituído por uma superfamília de múltiplos genes, que desempenha um importante papel na desintoxicação de xenobióticos tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), arilaminas e aminas heterocíclicas [Alberg *et al.*, 2006]. Como consequência deste metabolismo os compostos podem ser activados resultando na formação de metabólitos genotóxicos e mutagénicos, contrariando a sua função primitiva como “sistema de defesa” contra os metabólitos tóxicos das plantas [Nebert, 1997].

Foram identificadas quatro famílias do citocromo P450 envolvidas no metabolismo oxidativo de xenobióticos nas células do tecido pulmonar, respectivamente *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* e *CYP4*. No entanto, a maioria dos dados relativos aos estudos

envolvendo a suscetibilidade ao cancro do pulmão referem-se apenas às famílias *CYP1* e *CYP2* [Economou *et al.*, 1994].

O gene *CYP1A1* está incluído na designada “bateria de genes da aril-hidrocarboneto” (AHH), com expressão nas células do tecido pulmonar [Gresner *et al.*, 2007]. A aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH) catalisa a monooxigenação dos HPA originando produtos fenólicos e epóxidos que podem ser carcinogénios [Božina *et al.*, 2009]. A sua expressão, no tecido pulmonar das mulheres, é significativamente superior à dos homens. Nas mulheres, a indução desta enzima está associada não só com a exposição a compostos genotóxicos endógenos mas também com hormonas endógenas em circulação [Grybowska E. *et al.*, 2000]. Diversos polimorfismos deste gene foram identificados mas apenas dois foram associados a um aumento da actividade catalítica das isoformas desta enzima resultando num aumento dos níveis de metabólitos electrofílicos derivados dos HPA. Os dois polimorfismos deste gene, *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*, resultam, o primeiro do aparecimento de um local de restrição para a enzima Msp1, na região 3´ não codificada do gene, caracterizado pela transição 6235T>C, e o segundo localizado no exão 7, resulta numa enzima cujo resíduo de isoleucina, na posição 462, é substituído por valina (*Ile462Val, CYP1A1*C*) [Božina N. *et al.*, 2009]. Esta troca de aminoácidos ocorre numa região envolvida na ligação do grupo heme tendo sido associada a um aumento de actividade catalítica [Alberg *et al.*, 2006].

Este gene é expresso em tecidos epiteliais, nomeadamente no tecido pulmonar e está envolvido no metabolismo de constituintes do fumo do tabaco, como seja o benzo(a)pireno (BaP) [Garte *et al.*, 2001].

Os polimorfismos do gene *CYP2D6* têm sido associados a diferenças interindividuais no metabolismo das drogas (fármacos), a suscetibilidade ao cancro e a outras descobertas na área da saúde em estudos de epidemiologia molecular [Neafsey *et al.*, 2009]. Dado que este gene está envolvido na eliminação de muitas drogas e uma vez que a sua atividade é afetada pela genética do hospedeiro e pela relação entre as exposições ambientais e terapêuticas, existem muitas interações entre drogas, hospedeiro e ambiente. A influência que este gene exerce no metabolismo das drogas sugere que esta enzima polimórfica influencia o destino de diversas substâncias poluentes ambientais, na população em geral.

Os substratos do produto génico de *CYP2D6* são as aril ou alquil aminas, que contém um átomo de azoto ionizado a pH fisiológico. Alguns estudos indicam os pesticidas organofosfatados, como o paratião, cloropirifos e o diazinona, substratos desta enzima, através de reacções de dessulfatização oxidativa [Sams *et al.*, 2000]. O insecticida clorado “methoxychlor” e o fungicida hidroxibifenil ortho-fenilfenol, são metabolizados por esta enzima. A sua bioactivação oxidativa resulta em compostos mais activos e tóxicos.

O papel exacto desta enzima na activação desintoxicação metabólica varia com o substrato. Este gene é considerado como sendo essencialmente não indutível, pelo que a sua variação genética responde pela variabilidade interindividual da actividade enzimática [Garte *et al.*, 2001]. O alelo *CYP2D6*4*, contém um SNP, entre o intrão 3 e o exão 4, uma transição G para A (1846G>A)” do qual resulta um alelo não funcional. Este polimorfismo, é muito frequente nos Caucasianos, correspondendo a cerca de 70% a 90% dos indivíduos identificados como ML [Sachse *et al.*, 1997]. Este polimorfismo afeta o metabolismo de diversas drogas, tais como anti-depressivos, neurolépticos, anti-arrítmicos, analgésicos, anti-eméticos e medicamentos usados na terapia citostática [Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007].

As frequências genótípicas encontradas para os dois polimorfismos do gene *CYP1A1*, a transição 6235T>C e a Ile462Val, estão de acordo com os valores referidos para outras populações caucasianas e a sua distribuição pelas duas populações estudadas não demonstrou associações estatisticamente significativas (sig<0,05), nem quando procedemos à estratificação da população em função do sexo (Tabela 3.3). No entanto, uma análise comparativa das frequências alélicas para os alelos raros C/C, para *CYP1A1*2A* e G/G para *CYP1A1*2C*, revelaram valores de frequências superiores às observadas para as restantes populações caucasianas (pop. doentes: 11,95% para *CYP1A1*2A* e 10,73% para *CYP1A1*2C*/pop. controlo: 14,35% para *CYP1A1*2A* e 12,32% para *CYP1A1*2C*).

A distribuição e presença das frequências alélicas dos genes metabolizadores, evidencia um padrão étnico e geográfico específico, o qual tem sido demonstrado em diversos trabalhos publicados. Neste estudo, as frequências alélicas de *CYP1A1* diferem das referidas para a população caucasiana europeia, 5,8% para o alelo *CYP1A1*2A* e 1,8% para o alelo *CYP1A1*2C* [Garte *et al.*, 2001]. Os valores encontrados são muito

superiores aos mencionados mas equiparam-se aos obtidos por diversos estudos realizados em Espanha. Um estudo realizado a Norte de Espanha, nas Asturias, Lopez Cima *et al* (2012), apresentaram, para o alelo *CYP1A1**2A, uma frequência de 12,04% para uma população de doentes com cancro do pulmão e 10,70% para uma população controlo [López-Cima *et al.*, 2012]. Num outro estudo, numa população do sul de Espanha, as frequências encontradas para o mesmo alelo, entre populações com cancro do pulmão e controlo foram respectivamente 5,3% e 8,5%, valores muito superiores aos encontrados para a população do Norte da Europa [San Jose *et al.*, 2010]. Apesar da variáveis, estes valores apresentam-se superiores aos descritos para as populações do norte da Europa. Estas diferenças entre frequências indiciam, tal como foi mencionado para a população espanhola, um fluxo génico proveniente do norte de África promovendo uma divergência entre as populações do Norte e do Sul da Europa. A relação histórica entre as populações portuguesas, espanholas e do norte de Africa poderá explicar a sua similaridade. A corroborar esta hipótese encontramos estudos relativos ao complexo de histocompatibilidade HLA, os quais referem um “pool” genético relativo á população europeia do sul com as mesmas origens das populações Iberica e do Norte de África, devido especialmente ao fluxo génico ocorrido entre populações do Paleo-Norte de Africa para a Iberia [San José *et al.*, 2010].

As frequências do gene *CYP2D6*, tal como os alelos do gene *CYP1A1*, estão sujeitas a diferenças étnicas, verificando-se que os indivíduos “metabolizadores lentos” estão maioritariamente na Europa, os “metabolizadores ultra-rápidos no Norte de África e Oceania e os “metabolizadores intermédios” estão em prevalência na Ásia [Zanger *et al.*, 2004]. As frequências alélicas encontradas para este gene, 16,25% para a população de doentes e 17,5% para a população controlo, estão de acordo com as referidas por diversos autores, para o alelo *CYP2D6**4. Este alelo sendo o mais frequente na população Caucasiana, apresenta valores entre os 12% e os 25%, enquanto que na população asiática apresenta um valor próximo de 1% e nos africanos uma frequência que varia entre os 6% a 7% [Zanger *et al.*, 2004]. As frequências genótípicas estão de acordo com os resultados obtidos para outras populações caucasianas, com um genótipo PM (A/A) entre 5% a 10%, particularmente às encontradas para uma população portuguesa, num estudo relativo a neoplasias hematológicas (Tabela 3.3) [Lemos *et al.*, 1999].

Quando analisado individualmente, este gene apresenta uma associação estatisticamente significativa para a população feminina, após estratificação da população em função do sexo (Tabela 3.3). Este resultado não será alheio o facto dos indivíduos do sexo feminino possuírem um maior desequilíbrio na razão entre os mecanismos de agressão e os de reparação ao nível molecular, predispondo-os para o cancro do pulmão [Waxman *et al.*, 2009]. As mulheres possuem uma variabilidade inter-individual na expressão das DME que lhes é intrínseca e do qual resulta uma maior probabilidade de ter reacções adversas a drogas comparativamente ao homem. Esta variabilidade resulta da expressão da hormona do crescimento (HC). Esta é o factor hormonal chave que indica diferenças sexuais na expressão de um grande número de produtos génicos no fígado, incluindo as enzimas do citocromo P450 [Waxman *et al.*, 2009].

O padrão de distribuição das combinações de genótipos do gene *CYP1A1*, embora não tenha revelado associações estatisticamente significativas entre populações revelou uma prevalência da combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)* seguido das combinações *CYP1A1*2A(T/T)/CYP1A1*2C(A/G)* e *CYP1A1*2A (T/C)/CYP1A1*2C (A/A)* para ambas as populações (Tabela 3.7). O estudo, avaliando sub-populações correspondentes a cada combinação confirma a prevalência da combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)* revelando associações estatisticamente significativas entre populações e as variáveis demográficas, (Tabela 3.8). Para a subpopulação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C(A/G)* apenas se apresentaram estatisticamente significativas as associações entre populações e consumo de álcool, hábitos tabágicos e história familiar.

O alelo *CYP1A1*2A* tem sido associado a uma aumento da atividade catalítica resultando num aumento significativo de metabólitos eletrofilicos derivados dos HPAs, comprovado por elevadas quantidades de aductos de ADN-HPA nos pulmões de indivíduos com este tipo de cancro [Božina *et al.*, 2009]. Num estudo envolvendo a população Japonesa, foi demonstrado que indivíduos com os dois alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* possuíam uma suscetibilidade aumentada sete vezes, para o carcinoma das células pequenas do pulmão [Nakkachi *et al.*, 1995].

Uma vez que o consumo de tabaco pode modular o efeito cancerígeno dos seus metabólitos, o consumo elevado confere a um portador deste alelo um risco acrescido

relativamente a um não portador. Nestas circunstâncias, a cessação tabágica revela-se importante uma vez que, com o consumo de tabaco, compostos como as nitrosaminas, derivados N-nitrosos, alcaloides, e HPA são absorvidos e metabolizados rapidamente, aumentando a sua concentração ao nível pulmonar. A cessação está associada a uma diminuição do declínio da função pulmonar e um risco reduzido de hospitalização e mortalidade precoce. As mulheres possuem um declínio rápido da função pulmonar, quando comparadas com indivíduos do sexo masculino com o mesmo consumo. No entanto, após cessação a sua recuperação é muito mais rápida, adquirindo um rápido ganho da função pulmonar [Bertram *et al.*, 1981]. Segundo Wu *et al.* (2011), para indivíduos com diagnóstico de carcinoma das células não pequenas, em estadio precoce, a cessação tabágica promove uma redução até 66% da mortalidade, relativamente aos indivíduos que não cessaram o consumo. Para o carcinoma das células pequenas a redução da mortalidade é de 46%. A subpopulação com a combinação *CYP1A1(T/T)/CYP1A1*2C (A/A)* possui 79,7% dos indivíduos com cessação, num período de um ano antes do diagnóstico, conduzindo a um declínio da funcionalidade pulmonar, ao qual se associa, provavelmente uma fragilidade pulmonar, traduzida numa prevalência de indivíduos em estadio IV, na altura do diagnóstico. Apesar das bebidas alcoólicas poderem ter efeitos contrários, consoante têm anti-oxidantes ou não na sua composição, o efeito tóxico direcionado para a presença do composto químico acetaldeído, poderá exercer um efeito modulador relativamente a este gene. Segundo Shimada Tsutomu *et al.* (2004) a presença de determinados HPA pode afetar, mesmo inibir, o metabolismo de outros HPA atuando como inibidores de elementos do citocromo P450, tais como 1A1, 1A2 e 1B1. Este fenómeno causa alterações na sua capacidade para transformar células quando um único HPA ou uma mistura destes compostos é ingerida pelo indivíduo, influenciando a determinação do risco [Shimada Tsutomu *et al.*, 2004]. A presença de antecedentes familiares representa uma “fragilidade” individual, que exercerá possivelmente um efeito somativo semelhante ao referido para o álcool.

Os polimorfismos estudados não evidenciaram uma associação estatisticamente significativa com as restantes variáveis estudadas. Esta situação parece resultar de frequências genóticas reduzidas, quer do alelo raro na forma homozigótica quer em heterozigotia. Desta forma, embora pareça clara a ação, em fumadores, da combinação genótica em homozigotia, o aumento da atividade catalítica resultante do

polimorfismo num dos genes ou em ambos não parece evidente. O envolvimento de determinados comportamentos ou características da própria população parecem representar uma fração importante na determinação e na modulação da ação do gene bem como a sua interação com outros genes. A interação entre genes de fases diferentes do metabolismo será abordada nas seções seguintes.

O estudo relativo às variáveis clínicas não revela associações estatisticamente significativas para os genes individualmente. No entanto, após divisão da população em função dos hábitos tabágicos, o estadio apresentou uma associação estatisticamente significativa, com prevalência do estadio IV, para a combinação genótipica *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)* (sig=0,007). Apesar da avaliação ter sido realizada com um número reduzido de indivíduos, o elevado número (N=46) de doentes em estadio IV, com a combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)* é reveladora da possível ação desta combinação de genótipos no processo da carcinogénese química associada ao fumo do tabaco (Tabela 3.11). Esta associação foi confirmada através do estudo de regressão logística (Tabelas 3.12 e 3.12). Este estudo revela que os indivíduos com a combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)* possuem um risco 5,0 vezes superior para o estadio IV relativamente a *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/G)*, sendo este risco aumentado quando a esta combinação associamos os hábitos tabágicos, apresentando um risco cerca de 6,0 vezes superior.

Estes dois polimorfismos parecem estar associados de tal modo que o impacto individual de cada um dificilmente é avaliado ou não possui expressividade como modulador da suscetibilidade. Por avaliação individual, não foi possível indicar qualquer associação com as variáveis demográficas e clínicas mas, ao combinarmos os dois alelos, os resultados foram reveladores de um possível envolvimento destes na população de doentes. O facto de possuímos uma baixa frequência alélica levou a que associássemos os homozigóticos raros com os heterozigóticos. Os resultados mostraram que ambas as populações se subdividem preferencialmente entre duas combinações genótipicas e que estas apresentam impacto na avaliação das variáveis demográficas definidas como fatores de risco, quer seja pelo consumo de álcool, hábitos tabágicos, cessação tabágica ou história familiar. Será importante reforçar que a população de doentes não possui profissões de risco assinaláveis, não possui, ao nível ambiental, exposições de risco relevantes e possuem cargas tabágicas e tempo de consumo

semelhantes à população controle. Estas semelhanças permitem estabelecer um padrão comum para ambas as populações.

Uma meta-análise recente, constituída por 20,209 indivíduos demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo da *MspI*, *CYP1A1*2A* e as populações fumadoras asiáticas e caucasianas [Ya-nan Ji *et al.*, 2012]. Neste estudo foi demonstrado a presença de associações estatisticamente significativas quando as populações eram analisadas em função da etnia, sexo ou tipo histológico. Na ausência dessa estratificação não foram encontradas associações estatisticamente significativas. Esta situação foi observada para a população de não fumadores. Este estudo corrobora alguns dos resultados encontrados para a população portuguesa.

Os três genes da família dos CYPs, *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP2D6*4* foram combinados e avaliada a sua distribuição pelas duas populações (Tabela 3.14). Duas combinações foram identificadas pela sua prevalência *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/ CYP2D6 (G/G)* e *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/ CYP2D6 (G/A)*. A combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/ CYP2D6 (G/G)* apresentou-se prevalente para as duas populações, com mais de metade dos indivíduos da população de doentes portadores desta combinação. As subpopulações pertencentes a estas duas combinações foram avaliadas relativamente à sua associação com as variáveis demográficas e posteriormente para as variáveis clínicas. As associações estatisticamente significativas prevalentes na subpopulação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/ CYP2D6*4 (G/G)*, nomeadamente para o sexo, os antecedentes familiares, o consumo de álcool e os hábitos tabágicos reforçam a sua prevalência na população de doentes. Refira-se que apesar da variável antecedentes familiares apresentar um intervalo de confiança muito grande, consequência do número reduzido de indivíduos analisados, o seu limite inferior é maior do que 1, permitindo afirmar que esta variável confere, quando presente, uma suscetibilidade aumentada para esta doença. A combinação genótipica *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6 (G/A)*, presente em 19,7% dos doentes apresenta significância estatística para o sexo, hábitos tabágicos e cessação tabágica.

Se por um lado é aceite a expressividade do gene *CYP1A1* no pulmão e o seu envolvimento no metabolismo dos carcinogénios do tabaco, já a expressão do gene *CYP2D6* no pulmão é controversa, estando ainda por provar a sua contribuição na

ativação *in situ* da carcinogénese neste órgão [Nakkachi *et al.*, 1995]. Este gene está associado ao metabolismo de diversas drogas, como sejam os medicamentos aplicados na terapêutica citostática, sendo responsável pelo efeito adverso a drogas resultante da sua incapacidade em metabolizar, por perda de atividade catalítica, ou na falha terapêutica resultante de uma metabolização ultrarrápida. Considerando as duas subpopulações em função dos hábitos tabágicos, encontramos para as duas combinações prevalentes na população de doentes, duas associações estatisticamente significativas entre a combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6 (G/A)*, a metastização e o estágio. Para a combinação *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6 (G/G)* apenas encontramos significância relativamente à histologia. Esta última associação remete para a exposição a carcinogénios, uma vez que a actividade catalítica de *CYP1A1* conduzirá a um aumento da concentração de substâncias reactivas resultando na formação de aductos de ADN. Estes aductos de ADN podem originar um padrão de mutações no tecido pulmonar, resultando num tipo histológico específico.

A associação entre *CYP1A1*2A (T/T)/CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6 (G/A)* e a metastização e o estadio, na altura do diagnóstico, parece confirmar um aumento de suscetibilidade dado pelo gene *CYP2D6*. A presença de metástases e do estadio IV foram as características prevalentes encontradas nesta associação conferindo um mau prognóstico.

4.2.2. Polimorfismo das enzimas da fase II- Glutathionas S-transferases (GSTs) e N-acetiltransferases (NAT-2)

As glutathionas S-transferases constituem uma superfamília multifuncional de enzimas que desempenham um papel fundamental na fase II do processo de desintoxicação celular. Elas catalisam as reações de conjugação entre a glutathionas (GSTs) e um composto químico endógeno ou exógeno, com um grupo funcional electrofilico, tais como os produtos do stress oxidativo, os poluentes ambientais e carcinogénios, resultando produtos mais hidrofílicos, por forma a serem excretados. Os compostos electrofilicos ligam-se à molécula de ADN, formando aductos com consequentes mutações nas moléculas de ADN. Ao exercerem a sua atividade, as GSTs

protegem a célula dos efeitos citotóxicos e mutagénicos de compostos reativos, tais como os carcinogénios associados ao consumo do tabaco, através de um processo de conjugação, originando metabólitos excretáveis.

As enzimas *GSTM1* e *GSTP1* actuam especificamente sobre compostos eletrofilicos hidrofóbicos, dos quais são exemplo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos derivados dos epóxido, tais como os diol epóxidos do benzo(a)pireno ou do benzo(c)fenantreno, os compostos com grupos carbonil α e β insaturados incluindo a acroleína (presente no fumo do cigarro) ou as quinonas contendo produtos da oxidação das catecolaminas. A enzima *GSTT1* está envolvida no metabolismo de uma classe mais restrita de compostos, como sejam o monohalometano e o oxido de etileno. É responsável pela ativação de diversos dihaloalcanos, por exemplo o diclorometano, por conjugação com a glutathiona reduzida (GSH) forma um composto reativo o S-clorometilglutathiona [Sørensen *et al.*, 2007; Melissa Rotunno *et al.*, 2012]. O diclorometano é um composto extensamente aplicado nos produtos farmacêuticos bem como na síntese de plásticos [Hayes e Strange, 2000].

O polimorfismo mais comumente encontrado nos genes *GSTM1* e *GSTT1* é uma deleção total do gene com consequente ausência total da enzima (genótipo nulo). Diversos estudos caso-controlo demonstraram uma forte associação entre a deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o cancro do pulmão evidenciando a grande percentagem de indivíduos com genótipo nulo relativamente à percentagem presente na população de referência [Norppa *et al.*, 1997]. No entanto, estes resultados têm sido envolvidos em controvérsia, com outros estudos negando ou não conseguindo corroborar tais associações. É o caso de um estudo realizado com trabalhadores expostos a pesticidas organofosfatados, cujo DNA lesado em fumadores com genótipo nulo, para *GSTM1* e *GSTT1*, era semelhante ao observado para indivíduos, fumadores, com os dois genótipos presentes [Singh *et al.*, 2011]. Este resultado poderá dever-se a interações dos genótipos com fatores ambientais ou mesmo consequência do fumo do tabaco o qual reduz a actividade de GST nos pulmões [Singh *et al.*, 2011]. O genótipo nulo de *GSTM1* tem sido relacionado com o aumento de adutos de ADN, com a mutagenicidade na urina e com um aumento de mutações somáticas específicas [Rotunno *et al.*, 2012].

Um polimorfismo frequente do gene *GSTP1* resulta da transição A→G, localizada no domínio de ligação do substrato, promovendo a substituição do aminoácido isoleucina, na posição 105, pelo aminoácido valina, Ile¹⁰⁵Val. A enzima *GSTP1* é a isoforma mais abundante nos pulmões e parece ser responsável pelo metabolismo de carcinogénios inalados. Indivíduos com o genótipo Ile/Val ou Val/Val exibem reduzida atividade de desintoxicação comparativamente com os indivíduos com o genótipo Ile/Ile. Os indivíduos portadores de um único alelo com a base G (guanina) demonstraram possuir níveis elevados de aductos nos pulmões e elevados níveis de aductos PAH-DNA em linfócitos humanos [Grybowska *et al.*, 2000]. Estudos relativos à avaliação da atividade enzimática desta enzima sugerem que a presença destes resíduos, valina ou isoleucina, próximo do centro catalítico, alteraria a geometria de tal modo que na presença do resíduo de isoleucina a enzima apenas teria atividade para substratos pequenos enquanto que na presença do resíduo de valina a enzima catalizaria reações com substratos maiores, tais como HPA [Hu *et al.*, 1997]. Esta actividade diferencial justificaria os resultados ambíguos encontrados nos diversos estudos, nomeadamente em estudos de meta-análise e de pool- análise, com estudos selecionados, onde os primeiros demonstram a falta de associação e os últimos apontam para um risco aumentado para os portadores do alelo de valina. [Pliarchopoulou *et al.*, 2012].

As frequências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* variam significativamente entre populações de diferentes etnias. Para os caucasianos, o genótipo nulo de *GSTM1* possui uma frequência que varia entre 38%-67%. As frequências encontradas quer na população de doentes (41,0%) quer na população controlo (44,3%) estão de acordo com os valores referidos em estudos de populações caucasianas europeias bem como de acordo com valores encontrados para a população portuguesa em estudos associados com o cancro do pulmão e neoplasias hematológicas (Moreira *et al.*, 1996; Lemos *et al.*, 1999). A deleção do gene *GSTT1* apresenta uma frequência entre 10% a 20% na população caucasiana [Matakova *et al.*, 2009]. Os valores encontrados neste trabalho para a população portuguesa são ligeiramente superiores, 33,3% para a população de doentes e 23,7% para a população controlo.

Grande parte dos estudos envolvendo estas enzimas referem uma associação do alelo nulo de *GSTM1* com um aumento da suscetibilidade para o cancro do pulmão, nomeadamente com o carcinoma das células não pequenas, reconhecendo uma

diminuição da sobrevivência para doentes com este genótipo [Benhamou *et al.*, 2002; Sweeney *et al.*, 2003]. Esta diminuição na sobrevivência, segundo Goto *et al.*, estaria associada com o consumo de tabaco e com o aumento da formação de adutos resultantes da associação entre ADN e carcinogénios, no tecido pulmonar. O genótipo nulo teria maior tendência para formar adutos, nos pulmões, e desenvolver cancro resultante de mutações no *TP53*, K-ras e/ou em outros genes envolvidos no desenvolvimento do tumor, crescimento e metástases. A presença do genótipo nulo associado a estas mutações, conduziria a um tumor mais agressivo e a uma diminuição da sobrevivência [Sweeney *et al.*, 2003].

A avaliação de *GSTM1* individualmente, não revelou qualquer associação estatisticamente significativa entre populações, nem quando estratificadas em função do sexo, nem quando consideradas as variáveis demográficas e clínicas. Na verdade, mesmo quando estudados em associação a ação deste gene parece não ser prevalente relativamente aos outros dois genes estudados, *GSTT1* e *GSTP1*. Estes dados contrariam o que foi dito relativamente a estudos realizados por diversos autores [Benhamou *et al.*, 2002, Sweeney *et al.*, 2003; Pliarchopoulou *et al.*, 2012].

Num estudo realizado por Yang *et al.*, este referiu a falta de associação entre o genótipo nulo de *GSTT1* e o genótipo G/G (alelo raro) de *GSTP1* e a sobrevivência de indivíduos com cancro do pulmão [Yang *et al.*, 2002].

No estudo realizado, a população de doentes tem um consumo de tabaco muito semelhante ao da população controlo, sem diferenças estatisticamente significativas quer para a variável carga tabágica, quer para o tempo de consumo. Apenas a quantidade de consumidores de tabaco inalado é muito superior na população de doentes relativamente à população controlo. Este padrão de consumo entre as populações estudadas, mostra uma constância para a quantidade de carcinogénios e adutos formados, resultantes do consumo de tabaco nas duas populações. No entanto, o controlo da intensidade de consumo (carga tabágica) bem como o tempo de consumo não foi evidenciado nos estudos referidos pelo que esta pode ser uma das razões da discrepância observada.

O gene *GSTT1* revelou diferenças estatisticamente significativas quando comparados os seus genótipos entre populações (sig=0,030, OR= 1,6) e quando analisados para a população masculina (sig=0,024;OR= 1,84). A razão gene

presente/gene ausente apresenta um valor idêntico (2,0) para a população de doentes, quer considere ou não a população em função do sexo. No entanto, a população controlo global revela uma razão superior (3,0) e dentro do grupo dos indivíduos do sexo masculino esta é ainda maior (3,6) evidenciando um número superior de indivíduos com o gene presente relativamente á população de doentes. Este estudo não apresentou associações estatisticamente significativas de *GSTT1* quando foram consideradas as variáveis demográficas e clínicas. A associação estatisticamente significativa encontrada para este gene e o sexo masculino, dada a prevalência da deleção na população de doentes, evidencia uma associação resultante possivelmente dos hábitos tabágicos prevalentes nesta sub-população.

O gene *GSTP1* embora não revele uma associação estatisticamente significativa entre populações, a sua distribuição revela-se estatisticamente significativa para o sexo feminino (sig=0,016). Considerando as razões (G/G(genótipo raro))/(A/A) e (G/G (genótipo raro))/(A/G) no sexo feminino, verificamos que estas são muito superiores na população de doentes relativamente à população de controlo (Pop doentes: 1,16; 0,56/ Pop. controlo: 0,30 ; 0,13, respetivamente) evidenciando uma prevalência significativa do alelo raro na população de doentes, do sexo feminino. Relativamente às variáveis demográficas e clínicas o gene, individualmente, não apresenta associações estatisticamente significativas. Este gene é expresso preferencialmente nos pulmões e a presença do alelo *Val105* está associado a um aumento da atividade catalítica para os diol epóxidos dos HPA, quando comparado com a actividade do alelo *Ile105*. A evidencia de uma associação estatisticamente entre ser doente do sexo feminino e o cancro do pulmão parece estar associada a uma fragilidade do sexo feminino que, em associação com o fumo do tabaco, evidenciará um declínio rápido das funcionalidades do pulmão comparativamente com os homens fumadores. Esta fragilidade inerente ao sexo, associada ao consumo de tabaco e a um ou mais genótipos de suscetibilidade irão conferir maior risco ao sexo feminino. Esta explicação é corroborada com o aumento exponencial da taxa de incidência de cancro do pulmão. Esta é associada a um consumo cada vez maior de tabaco. No entanto, ao abordar o cancro do pulmão em função do sexo outros fatores deverão ser considerados. A confirmar estas observações temos o facto da que na população de doentes analisada, 39% eram mulheres sem hábitos tabágicos.

O estudo de regressão logística, estratificando a população em função do sexo e utilizando todos os genes estudados reforçou a importância de *GSTT1* na suscetibilidade ao cancro do pulmão no sexo feminino e de *GSTP1* (Ile105val) para o sexo feminino. Sem dúvida que apesar dos restantes genes, não evidenciarem risco eles contribuem para o resultado obtido no modelo proposto.

Por combinação dos génotipos destes três genes foi possível estabelecer a presença de duas combinações que se revelaram significativas para o valor de χ^2 (sig=0,020), *GSTP1(A/G) /GSTT1neg/ GSTM1 posit* e *GSTP1(A/G) /GSTT1posit/ GSTM1posit*. As variáveis demográficas associadas às combinações prevalentes de génotipos das GSTs permitiu criar um modelo que evidenciasse, por regressão logística, as principais variáveis e combinações de GSTs que mais contribuíam para o perfil “ser doente”. Foram selecionadas três combinações em função dos resultados obtidos relativos aos estudos dos genes individualmente e em função da maior variação de frequências encontrada para estas combinações entre doentes e controlo. Ser fumador (OR=4,8) e possuir a combinação *GSTP1 (A/G) /GSTT1 (neg) / GSTM1 (posit)* (OR=3,79) parece conferir maior risco relativamente à combinação *GSTP1 (A/G) /GSTT1 (posit) / GSTM1 (posit)*. Este resultado parece evidenciar a importância destes dois genes, *GSTP1* e *GSTT1*, no aumento da susceptibilidade ou da vulnerabilidade à exposição a xenobióticos ou outro tipo de compostos que de alguma forma podem ser prejudiciais quando acumulados. Assim, a combinação *GSTP1 (A/G) /GSTT1 (neg) / GSTM1 (posit)* poderá evidenciar a importância de *GSTT1* bem como a importância da interacção génica na modulação da resposta de um indivíduo aos diversos tipos de agressões quer por exposição ocupacional quer por exposição ambiental.

As enzimas glutatónicas foram avaliadas em função da sua importância nas variáveis clínicas analisadas. Individualmente, apenas *GSTP1* apresentou uma associação estatisticamente significativa com o tipo histológico, na sub-população do sexo masculino (Tabela 3.22). O tipo histológico prevalente associado com *GSTP1* (G/G) foi o carcinoma epidermoide enquanto que para os heterozigóticos foi o adenocarcinoma. Esta associação foi reforçada quando dividimos a população de doentes em função dos seus hábitos tabágicos (sig=0,007) ou mesmo quando dividimos esta população em função do sexo e hábitos tabágicos simultaneamente (sig=0,006). O adenocarcinoma foi o tipo histológico prevalente nos indivíduos heterozigóticos para *GSTP1 (A/G)*, 70,0%. No entanto, ao considerar o grupo dos indivíduos do sexo

masculino e/ou fumadores o tipo histológico prevalente para o genótipo, G/G, foi o carcinoma epidermoide.

Esta diferenciação dos tipos histológicos relativamente aos genótipos pode estar relacionada com o exposto anteriormente relativamente a uma alteração da atividade catalítica resultante da alteração de um resíduo de isoleucina para um de valina. Esta modificação da geometria do sítio catalítico vai alterar a deposição de carcinogénios no tecido alvo, originando diferentes tipos histológicos. A alteração da histologia em função do tipo e quantidade de carcinogénios a que o órgão está exposto está claramente evidenciado pela alteração ocorrida do tipo histológico de cancro do pulmão, de carcinoma das células pequenas para adenocarcinoma, durante a segunda metade do século XX. Esta alteração parece ter resultado das alterações do design do cigarro, a presença de filtros, bem como dos tratamentos a que o tabaco é atualmente sujeito por forma a reduzir os níveis de nicotina.

O estudo de regressão logística para avaliar qual o genótipo que mais contribuiria para o adenocarcinoma revelou que o genótipo mutado apresentava um risco 4,1 vezes superior relativamente ao genótipo A/A, com maior prevalência nos doentes. Este resultado corrobora o que atrás foi exposto e evidenciado pela primeira vez por Hu (1997), em que a alteração do sítio catalítico da enzima, resultante da substituição de isoleucina por valina, irá modificar a ação desta enzima de modo a catalizar reações com substratos maiores, tais como HPA [Hu *et al.*, 1997].

A combinação dos três genes revelou uma associação estatisticamente significativa, com prevalência para *GSTP1(A/G)/GSTT1(neg)/GSTM1(posit)* no carcinoma epidermoide e *GSTP1(A/G) /GSTT1(posit) / GSTM1(posit)* para o adenocarcinoma, no grupo dos fumadores (Tabela 3.26). Este resultado demonstra claramente uma interação entre genes, resultando numa modulação da resposta.

As enzimas N-acetiltransferases (NATs) são responsáveis pela acetilação de muitos grupos amino, hidroxil e sulfidril de diversos compostos, incluindo certas arilaminas carcinogénicas. A distribuição bimodal na taxa de eliminação da isoniazida (um fármaco anti-tuberculose) foi a base para a divisão clássica dos doentes em “acetiladores rápidos” e “acetiladores lentos”. O gene *NAT2* tem sido referido como o responsável pelas reacções de N-acetilação de aminas heterocíclicas e da O-acetilação

de metabólitos N-hidroxil de aminas heterocíclicas, referidas como procarcinogénios [Lemos *et al.*, 1999; Wormhoudt *et al.*, 1999].

A análise da distribuição dos diversos genótipos encontrados para o gene *NAT2* permitiu agrupar e classificar a população, através dos fenótipos, em acetiladores lentos e acetiladores rápidos. Embora a sua distribuição não revele uma associação estatisticamente significativa entre as duas populações evidencia, porém, uma associação estatisticamente significativa entre doentes e os indivíduos do sexo masculino, com prevalência para os acetiladores lentos. Esta associação é confirmada quando por regressão logística definimos um modelo para “ser doente com cancro do pulmão” com todos os genes e respetivos alelos estudados. Na população masculina, o fenótipo acetilador lento, aumenta a suscetibilidade para o cancro em cerca de duas vezes, relativamente ao fenótipo acetilador rápido.

Na presença de “acetiladores lentos” maior quantidade de metabólitos N-hidroxi-arilaminas são formados, os quais podem resultar na formação de aductos de ADN. Esta situação está descrita para o cancro da bexiga, justificando o elevado risco observado para os acetiladores lentos neste cancro [Wormhoudt *et al.*, 1999].

Alguns estudos evidenciaram a presença do gene *NAT2* nas células epiteliais próximas dos bronquíolos, embora em concentrações reduzidas, sugerindo que a enzima pode desempenhar um papel importante no metabolismo de poluentes inalados [Windmill *et al.*, 2000]. No entanto, contrariamente aos nossos resultados, o fenótipo “acetilador rápido” foi identificado como conferindo maior risco relativamente ao cancro do pulmão, em fumadores [Nyberg *et al.*, 1998]. Os resultados relativamente ao envolvimento de cada um dos fenótipos na suscetibilidade para o cancro do pulmão têm sido contraditórios, com estudos que demonstram uma ausência de associação entre o gene e o desenvolvimento da doença [Cascorbi *et al.*, 1996, Borlak *et al.*, 2006]. Segundo Borlack *et al.* (2006), esta variabilidade resulta do tipo de acetilação, podendo ser responsável pela modulação do risco de um indivíduo para um tipo particular de cancro. Assim, nos cancros onde a N-acetilação é um passo da desintoxicação, como no caso do cancro da bexiga associado á presença de aminas aromáticas, o fenótipo acetilador lento confere um risco maior. Por outro lado, nos cancros onde a N-acetilação é desprezável e a O-acetilação é um passo de activação, como no caso do cancro do cólon, associado a aminas heterocíclicas, o fenótipo “acetilador rápido”

parece conferir maior suscetibilidade [Borlak *et al.*, 2006]. Será ainda necessário considerar que o efeito deste gene, bem como de NAT-1, na susceptibilidade ao cancro do pulmão, está provavelmente dependente do órgão afectado, reflectindo uma dependência destes genes associada aos tecidos em que são expressos [Hayes *et al.*, 2000].

Segundo Oyama *et al.* (2007) a presença de um fenótipo acetilador lento associado a um genótipo nulo das glutatonas pode aumentar a formação de adutos de ADN no pulmão. Assim, sendo os indivíduos do sexo masculino os maiores consumidores de tabaco, na população de doentes, é razoável admitir que o fenótipo acetilador lento esteja associado ao sexo masculino.

Dividindo a população de doentes em duas sub-populações, acetilador rápido e acetilador lento, a aplicação do teste χ^2 , para as diversas características da população, revela um maior número de associações estatisticamente significativas dentro da sub-população de acetiladores lentos, confirmando, assim, que esta sub-população é maioritária, relativamente à sub-população “acetiladores rápidos”.

Na sub-população de acetiladores rápidos, a presença de indivíduos com familiares em primeiro grau com alguma forma de cancro confere um aumento de suscetibilidade para esta doença. Parece ser, no entanto, a única característica que se evidencia nesta sub-população mas que confere um risco superior ao evidenciado pela população de doentes (OR (acetiladores rápidos): 6,9/OR (acetiladores lentos): 5,1).

Através do estudo de regressão logística foi possível definir um modelo que associasse o fenótipo acetilador lento com as características demográficas que realmente contribuem para o perfil do indivíduo “doente com cancro do pulmão”. Das características que revelaram uma associação, por aplicação do teste do χ^2 , apenas o sexo, consumo de álcool e cessação tabágica se revelaram importantes e com um contributo no estudo de associação, conferindo ao fenótipo acetilador lento um aumento do risco de 2,18 (Tabela 3.7), quando apenas os genes e alelos individuais foram avaliados, para 3,88. Este resultado demonstra a importância da caracterização da população antes da abordagem a um estudo, onde a exposição ocupacional e ambiental, os hábitos de risco e algumas características herdadas, podem ser fundamentais para o resultado e desenvolvimento da doença. Este modelo confirma a importância das interações gene-ambiente (considerando como “interações do ambiente” todas as

exposições ocupacionais ou ambientais, bem como comportamentos que envolvam o consumo de substâncias definidas como tóxicas ou passíveis de ser metabolizadas pelas enzimas da fase I e II do metabolismo) no envolvimento da alteração da suscetibilidade para o cancro do pulmão.

Relativamente às variáveis clínicas, os fenótipos evidenciaram diferenças estatisticamente significativas para os tipos histológicos, com 89,6% dos doentes acetiladores lentos com carcinoma epidermoide e 72,7% dos doentes acetiladores rápidos com adenocarcinoma.

A metastização foi outra variável que evidenciou uma associação estatisticamente significativa com os acetiladores lentos, estando presente em 87,8% dos indivíduos doentes, na altura do diagnóstico. Este resultado estará provavelmente associado com a presença de estadios avançados, estadio IV, na altura do diagnóstico e que caracteriza a nossa população de doentes. A ausência de actividade catalítica desta enzima da fase II, para indivíduos com grandes cargas tabágicas e elevado tempo de consumo, irá facilitar a proliferação do tumor para zonas exteriores aos pulmões, promovendo a sua agressividade. Este resultado estará de acordo com o tipo histológico encontrado para este fenótipo. O modelo da Tabela 3.30 evidência a presença de duas variáveis que mais contribuem para a presença de metástases na altura do diagnóstico. O polimorfismo “acetilador lento” foi o único que revelou uma associação entre esta variável clínica, de entre os polimorfismos estudados. Apesar da variável cessação tabágica não contribuir significativamente para a metastização neste modelo, a cessação por um período inferior a um ano antes do diagnóstico, parece modular o efeito do polimorfismo sobre a capacidade do tumor em metastizar. Para este fato, pode contribuir a acumulação de carcinogénios no pulmão, resultante da ausência de actividade da enzima. Neste processo não estarão alheios os fenómenos epigenéticos, quer seja a metilação aberrante da molécula de ADN na sequência promotora de genes, quer a perda de heterozigotia nos genes supressores tumorais, como seja o *TP53*, resultando na sua inactivação [Risch *et al.*, 2008].

Esta inactivação do gene por metilação do promotor foi inicialmente identificada nos genes supressores tumorais. No entanto, é possível que a metilação do promotor silencie genes sem esta actividade ou com fraca actividade supressora. Estes genes terão funções celulares, quer seja na reparação da molécula de ADN, quer seja no

metabolismo de fármacos ou xenobióticos, dos quais são exemplo o *MLH1*, *MGMT* e *GSTP1*. A metilação aberrante demonstrou ser um processo importante na tumorigenese do pulmão de modo a ser utilizado como biomarcador [Risch *et al.*, 2008].

As Tabelas 3.32 e 3.33 representam estudos de regressão logística, evidenciando modelos que permitem identificar as variáveis que mais contribuem para o indivíduo, da região centro de Portugal, ser “doente com cancro do pulmão”. Tendo em consideração as variáveis demográficas estudadas e que caracterizam as duas populações, bem como as combinações de génotipos encontradas relativas aos polimorfismos dos genes das fases I e II do metabolismo, os modelos apresentados evidenciam a contribuição das interações gene-gene e gene-ambiente. Considerando que o sexo foi uma das variáveis que mais relevância teve neste estudo e que o consumo de álcool determinou um acentuado aumento da suscetibilidade da população de doentes para o cancro do pulmão, introduzimos estas duas variáveis no modelo, em associação com a combinação de génotipos estudada relativo às glutatonas e a variável dicotómica relativa ao fenótipo do NAT-2. Este modelo identifica na população de doentes, um grupo de indivíduos cuja suscetibilidade para o cancro é modulada pela interação destas quatro variáveis. Neste modelo, ser do sexo masculino possui um aumento da suscetibilidade 2,9 vezes maior do que ser do sexo feminino. Este aumento da suscetibilidade do sexo masculino deverá estar relacionado com o consumo de tabaco. Será importante lembrar que os indivíduos doentes possuem a mesma carga tabágica do que os indivíduos do controlo e o mesmo tempo de consumo, mas têm maior percentagem de fumadores. Apesar da contribuição do consumo de álcool não se revelar significativa, ela contribui para a suscetibilidade das outras variáveis. No estudo de associação apresentado na Tabela 3.1, o consumo de álcool em fumadores conferia uma suscetibilidade 4,5 vezes superior, relativamente a um não consumidor de álcool. A interação gene-gene, revela um aumento da suscetibilidade da combinação *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTT1(+)*, quando o fenótipo acetilador lento está presente, ao compararmos a contribuição desta combinação na sua ausência, 3,8 (Tabela 3.21). Poderá falar-se que, estando perante enzimas da fase II do metabolismo, o efeito será aditivo. Este efeito poderá estar relacionado com a acumulação de carcinogéneos no tecido pulmonar resultante da biotransformação e inalação resultante do consumo de tabaco e que não é excretado por inativação ou ausência das enzimas de conjugação. Esta acumulação de carcinogéneos influenciará a formação de aductos de ADN-HPA no tecido pulmonar, os quais são

iniciadores do processo da carcinogénese. Estes biomarcadores foram observados em tecido pulmonar de indivíduos com cancro do pulmão e homozigóticos para *Val105 GSTP1* bem como em células brancas do sangue de indivíduos fumadores, com combinação de glutatonas evidenciando homozigotia para *Val105 - GSTP1* [Butkiewicz, 2000, Risch, 2008].

No segundo modelo evidenciamos a contribuição das enzimas do citocromo P450 em todo o mecanismo da carcinogénese química. A sua presença no modelo anteriormente proposto, aumenta os valores de OR para ambas as combinações das glutatonas, bem como o valor relativo ao fenótipo acetilador lento (Tabela 3.32). Curiosamente o sexo deixa de representar uma variável com contribuição estatisticamente significativa para o modelo. As variações observadas neste modelo estão de acordo com a ideia anteriormente exposta. O facto das enzimas do citocromo P450 estarem activas no processo da biotransformação, irá promover a acumulação de carcinogénicos que não serão excretados de forma a impedir o efeito nefasto destes ao nível do tecido pulmonar.

Os resultados obtidos relativamente aos genes do citocromo P450 bem como aos genes das enzimas da fase II demonstram uma contribuição resultante da interação entre si. O envolvimento destes genes não demonstra resultados individuais significativos e a ideia de uma contribuição individual de genes com baixa penetrância, em mecanismos que conduzem á morte de um indivíduo, mesmo quando associados a factores de risco parece muito pouco provável. Sem dúvida, a interação destes genes entre si, bem como destes associados a outros envolvidos nos mecanismos de reparação ou nos mecanismos hormonais parece ser a melhor via de entendimento da carcinogénese química.

Na ausência deste mecanismo da fase II, a célula irá direccionar e ativar outros mecanismos alternativos por forma a eliminar os xenobióticos acumulados. No entanto, estes meios alternativos poderão não ser os mais eficazes ou poderão não ser a solução em todos os tecidos do organismo, tendo em conta que a expressão das enzimas metabolizadoras não é uniforme e que a sua suscetibilidade depende da exposição a determinados compostos por forma a exercerem o seu efeito. Assim, na ausência de um metabolismo eficaz a célula poderá acionar outros mecanismos alternativos mas eventualmente tal estará dependente do órgão e xenobióticos envolvidos.

A inconsistência de resultados obtida nos estudos de caso-controle resulta em parte da heterogeneidade das populações estudadas, na falha em considerar efeitos modificadores tais como a exposição ambiental (interações gene-ambiente,) ausência de modelos estatísticos consistentes e falha de aplicação de múltiplos testes estatísticos por forma a creditar os resultados encontrados, eliminando desta forma os falsos positivos. A aplicação do modelo de regressão logística sempre que os testes de associação evidenciaram significância estatística teve como objetivo eliminar a situação referida.

4.2.3. Envolvimento do gene *TP53*. Contribuição na ação das enzimas da fase I e II do metabolismo

As mutações no gene *TP53* podem ocorrer em fumadores, antes de qualquer evidência clínica de neoplasia, podendo ser um indicador de um risco aumentado para o desenvolvimento do cancro do pulmão [Wistuba *et al.*, 2002]. O *TP53* como gene supressor tumoral, tem um papel fundamental na resposta celular a danos na molécula de ADN [Perwez, 2006]. A metilação do ADN na sequencia promotora de genes evidenciou-se como parte de um mecanismo silencioso dos genes supressores tumorais no cancro do pulmão humano. A sua utilização como biomarcador permitiria uma detecção precoce do cancro com conseqüente benefício para o prognóstico. A importância deste gene no desenvolvimento do cancro do pulmão conduziu a um breve estudo avaliando uma possível associação deste com as enzimas da fase I e II do metabolismo.

A análise da distribuição da proteína mutada na população doente, dividida em sexo masculino e feminino, não revelou uma associação estatisticamente significativa, evidenciando uma prevalência de *TP53* marcado (mutado), para indivíduos do sexo masculino.

O estudo de associação entre *TP53* mutado, e as diversas variáveis clínicas, revelou uma associação estatisticamente significativa entre este e a localização do tumor. Esta associação parece evidenciar a o resultado da ação dos elevados níveis de carcinogêneos inalados sobre o epitélio do tecido pulmonar [Toledo *et al.*, 2008]. A diminuição na sobrevivência dos doentes está associada ao consumo de tabaco e ao

aumento da formação de adutos, resultantes da associação entre ADN e carcinogénios, no tecido pulmonar. Adicionalmente, as células do tumor afetadas acumulam elevadas quantidades de proteína mutada TP53 [Oren *et al.*, 2010].

Diversos estudos revelaram que os genótipos nulos de GSTs têm maior tendência para formar aductos nos pulmões, contribuindo para a carcinogénese. No entanto, o alelo *GSTP1105Val* foi reconhecido como possuindo uma atividade catalítica sete vezes superior para os diol-epóxidos. Estando claramente expresso no tecido pulmonar, a sua actividade sugere uma possível associação com a doença e suscetibilidade para o cancro. Assim, este gene foi avaliado relativamente a uma possível associação com a proteína TP53 mutada, embora não tenha sido encontrada qualquer associação estatisticamente significativa.

Considerando a localização tumoral, a associação entre esta e a combinação *GSTP1* e TP53 mutada, revelou-se estatisticamente significativa, com *GSTP1(A/G)/TP53+* prevalente nos lobos superiores. Tal como explicado anteriormente, esta prevalência de cancro no lobo superior de ambos os pulmões é evidenciada para consumidores de tabaco e parece resultar da frequência de inalação de carcinogénios. O estudo de regressão logística confirmou a prevalência da combinação *GSTP1(A/G)/TP53+* evidenciando, possivelmente, uma acção moduladora conjunta destes dois genes na suscetibilidade para o cancro do pulmão. Este resultado deveria ser aprofundado e avaliado com um número bastante superior de casos estudados, uma vez que a associação destes dois genes poderia reforçar a acção da proteína TP53 como indicador de um risco aumentado para o desenvolvimento de cancro.

Capítulo V

CONCLUSÕES

5. Conclusões

O cancro é uma doença multifatorial, o que traduz o envolvimento e a interacção de diversos factores genéticos e ambientais no seu desenvolvimento. Um exemplo marcante desta afirmação é o cancro do pulmão. Doença que no início do século XX possuía uma incidência pouco significativa mas que, à medida que a sociedade se tornou mais industrializada e o consumo de tabaco se generalizou ao nível mundial, teve uma escalada vertiginosa da incidência, assumindo atualmente uma relevância particular em Oncologia, não só por ser a primeira causa de morte por cancro, mas também pelos deficientes meios de rastreio disponíveis.

A evidências de que o ambiente poderia modular o desenvolvimento desta doença foram sendo reveladas pelos trabalhos desenvolvidos, reconhecendo-se, porém, uma pequena contribuição das novas técnicas de diagnóstico para as possíveis causas da crescente incidência. Os trabalhos de Doll e Hill, publicados em 1950, são marcantes na identificação dos factores ambientais e comportamentais como variáveis associadas ao cancro do pulmão, quando estes apresentaram o consumo do tabaco como uma causa determinante para o desenvolvimento desta doença.

Os estudos que se sucederam, envolvendo o consumo do tabaco, a identificação e classificação dos seus constituintes em substâncias carcinogénicas e/ou pró-carcinogénicas e a identificação, em laboratório, de substâncias do meio ambiente com efeitos semelhantes ou idênticos aos observados nos constituintes do tabaco contribuíram, significativamente, para o conhecimento actual das associações entre factores ambientais e cancro do pulmão. Estas associações revelaram-se de tal modo importantes que conduziram à formação de uma agência da OMS (“International

Agency for Research on Cancer” - IARC), para coordenar e orientar a investigação epidemiológica e laboratorial das causas do cancro humano.

Desde cedo, os estudos evidenciaram uma grande variabilidade da resposta individual, quer relativamente à acção dos compostos carcinogénicos, quer à acção de substâncias utilizadas na terapêutica. Esta variabilidade interindividual orientou diversas avaliações das características individuais, como possíveis responsáveis pela modulação da resposta aos factores ambientais.

Sendo uma das explicações para a existência desta variabilidade a aquisição pela espécie humana de mecanismos destinados à metabolização de alcalóides e de outras substâncias produzidas pelas plantas, mas tóxicas para o organismo humano, as enzimas metabolizadoras de xenobióticos foram apontadas como responsáveis por esta variabilidade interindividual. Mais tarde, foi evidenciado o papel dos produtos codificados por genes supressores tumorais e por protooncogenes no trajecto de múltiplos passos da carcinogénese química.

Os resultados de estudos de associação que se seguiram, entre enzimas metabolizadoras de xenobióticos e cancro do pulmão, são em grande número, embora frequentemente controversos, mesmo quando abordam o mesmo gene e o mesmo tipo de cancro. Com os estudos de “pool”-análise e de meta-análise foram encontradas razões para a génese de algumas das contradições registadas e foram conseguidos avanços adicionais no conhecimento das interacções entre os factores genéticos e os factores ambientais.

A variabilidade das frequências alélicas registadas nas diferentes populações, para os alelos que codificam as enzimas de metabolismo, veio esclarecer algumas das contradições registadas por diferentes grupos de investigação. De facto, os polimorfismos destas enzimas não se distribuem regularmente pelas diferentes populações. Por outro lado, os estudos de “pool”-análise e de meta-análise permitiram verificar a grande diversidade presente na composição das amostras populacionais utilizadas, seja em termos de extracção étnica, do sexo, da idade, de estilos de vida ou da ocupação profissional, entre outras características que podem interferir, isoladamente ou em conjunto, na iniciação e desenvolvimento do cancro, sendo difícil a avaliação individualizada de cada uma deles.

No presente trabalho, o estudo por regressão logística, de uma população de doentes com cancro do pulmão e de uma população controlo da Região Centro do País, permitiu evidenciar que apenas o sexo, os antecedentes familiares de cancro, o consumo de álcool e a cessação tabágica há menos de um ano em relação ao momento do diagnóstico, estão associados, com força estatisticamente significativa, ao perfil do “doente com cancro do pulmão”. Registe-se ainda, como facto relevante, que ambas as populações partilham o mesmo comportamento em termos de carga tabágica e tempo de consumo. Sendo o fumo de tabaco, um fator etiológico comprovado para o cancro do pulmão, e não se tendo identificado, em termos ocupacionais, diferenças significativas entre as duas populações, a similitude da carga tabágica e do tempo de consumo nas duas populações sugere a existência de outras variáveis presentes nos indivíduos com cancro que contribuem para a iniciação e o desenvolvimento desta doença.

Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre alguns dos alelos que definem características das populações no âmbito do metabolismo de xenobióticos e o sexo, na padronização de um perfil para o indivíduo com esta doença. Assim, enquanto que GSTT1 nulo e o fenótipo acetilador lento de NAT2 contribuem significativamente para o perfil “ser doente com cancro do pulmão do sexo masculino”, os alelos CYP2D6*4 e GSTP1 (G/G) contribuem significativamente para o mesmo perfil, na população feminina. Relativamente às variáveis clínicas do doente e com associação estatisticamente significativa, apenas GSTP1 está associado ao tipo histológico, em indivíduos do sexo masculino, e o fenótipo acetilador lento ao tipo histológico do tumor e à metastização.

A análise multivariada relativa ao efeito conjunto de diversos genes, embora negligenciada nos primeiros estudos, foi, posteriormente considerada em diversos estudos de susceptibilidade. Neste trabalho, avaliamos a contribuição dos genes em função da fase do metabolismo em que estão envolvidos.

A fase I do metabolismo é uma fase importante mas eventualmente “perigosa” para o organismo, dependendo eventualmente do ambiente em que este se insere e da capacidade de conjugação das enzimas envolvidas na etapa subsequente, a fase II. Os resultados parecem justificar o que se acaba de afirmar. Foram encontradas duas combinações, para os alelos do gene *CYP1A1* que se revelaram prevalentes na população de doentes e cujos fenótipos identificaram uma actividade catalítica normal

das enzimas, *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/A)* ou com um dos alelos com actividade aumentada, *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/G)*. Duas combinações com os três genótipos revelaram-se prevalentes em ambas as populações, *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6 (G/G)* e *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6 (G/A)*.

A combinação dos dois genótipos CYPs, *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/A)*, revelou-se significativa para o estadiamento do tumor, conferindo um risco cinco vezes superior relativamente a *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/G)*. Quando avaliada no subgrupo da população com hábitos tabágicos, este risco é aumentado para cerca de seis vezes, para a condição de ser doente em estadio IV, relativamente ao estadio IIIB. A combinação dos três genótipos revela uma associação de *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6(G/A)* com o estadio e a metastização e de *CYP1A1*2A (T/T)/ CYP1A1*2C (A/A)/CYP2D6(G/G)* para o tipo histológico.

Realizando o mesmo estudo de combinações para as enzimas da fase II, nomeadamente as isoformas das glutationas, a presença das combinações *GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTM1(+)* e *GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTM1(+)* revelou um risco 3,8 e 2,7 vezes superior para a condição de ser doente, quando em associação com hábitos tabágicos e o sexo. Estas combinações revelaram-se importantes quando foi avaliada a sua contribuição para o tipo histológico do tumor, no grupo dos fumadores. A contribuição de *GSTP1* neste resultado parece ser preponderante, tendo sido confirmado através do estudo de regressão logística entre este último e os dois tipos histológicos principais, adenocarcinoma e carcinoma das pequenas células. O fenótipo acetilador lento revelou uma associação com susceptibilidade aumentada, com um risco cerca de 3,9 vezes superior para os indivíduos doentes, quando em associação com o sexo, o consumo de álcool e a cessação tabágica, até um ano antes da altura do diagnóstico.

Os resultados anteriores sugerem uma associação potencialmente nefasta entre a actividade catalítica regular das enzimas da fase I com uma actividade nula ou deficiente das enzimas da fase II, quando são consideradas duas características da população, sexo e hábitos tabágicos. Esta avaliação parece razoável tendo em consideração que a biotransformação dos constituintes do fumo do tabaco resulta num aumento da concentração de carcinogénios no epitélio pulmonar e que estes não são excretados devido à prevalência das combinações das enzimas da fase II com actividade nula. A

consequente acumulação de carcinogénios poderá promover a formação de adutos de ADN iniciadores da carcinogénese, para a qual contribuirá ainda a presença de radicais livres de oxigénio (ROS) produzidos de forma endógena e que não são eliminados por ausência de actividade da glutathiona peroxidase.

Esta contribuição das enzimas da fase II é evidenciada pelo estudo de regressão logística, associando o fenótipo acetilador lento e a cessação tabágica um ano antes do diagnóstico à presença de metástases na altura do diagnóstico.

Os dois estudos de regressão logística avaliando, o primeiro a contribuição das combinações das enzimas da fase II e o segundo a contribuição das combinações das enzimas das fases I e II, em associação com o sexo e o consumo de álcool, para o perfil do indivíduo doente com cancro do pulmão, parecem confirmar uma dependência da actuação destas enzimas. A contribuição das enzimas da fase II, para o perfil que caracteriza um doente com cancro do pulmão, aumenta quando a esta associamos a contribuição de uma combinação de enzimas da fase I, com fenótipo de actividade regular ou aumentada.

A instabilidade génica é um dos factores para o desenvolvimento da carcinogénese que se associa a mutações do gene supressor tumoral, *TP53*. Os resultados obtidos parecem confirmar uma associação de *TP53* mutado com um aumento da genotoxicidade resultante da incapacidade de eliminação de carcinogénios por enzimas da fase II, particularmente pela *GSTP1*.

A avaliação parcelar da contribuição de uma única característica de um indivíduo, de uma só enzima do metabolismo de xenobióticos ou de um único factor ambiental para o desenvolvimento da carcinogénese química num organismo, não reflete a verdadeira contribuição deste para o desenvolvimento da doença pois não considera as suas interacções ao nível endógeno e/ou exógeno. A Tabela 4.1 reflete, de forma sumária, as diferentes abordagens realizadas para cada gene e as respectivas associações encontradas na população de doentes. Foram, ainda, realizados estudos de associação e construção de modelos, por regressão logística, de forma a permitir a definição de um “perfil” do doente com cancro do pulmão.

Desta forma, é fundamental proceder a análises multivariadas para se chegar a uma condição mais próxima do que acontece *in vivo*. Este trabalho pretende refletir a importância destas interações em todo o processo.

Tabela resumo 4.1. Resumo das associações encontradas na população de doentes. Estudos de associação e construção de modelos, por regressão logística, que possam permitir definir um “perfil” do doente com cancro do pulmão:

a) Nas características demográficas e associadas a fatores de risco

| Caraterísticas das populações | População de doentes | População controlo |
|---------------------------------|--|--|
| Idade | *prevalência [36; 66], N= 119, 59,5%, *, AA: 63,06 ± 10,17, [36; 87] *sig <0,001 | *prevalência [67; 97], N= 161, 65,2% *, AA: 70,92 ± 10,95, [40; 97] |
| Sexo | *prevalência sexo masculino (74,5%) *sig= 0,010, OR= 1,7, IC= [1,13; 5,67] | *prevalência sexo masculino (63,2%) |
| Profissão de risco | * identificadas 29,6% | *identificadas 48,2% *sig< 0,001, OR= 2,21, IC= [1,44; 3,39] |
| História familiar | *com familiares 1º grau: 31,2% * sig= 0,001, OR= 5,34, IC= [3,05; 9,37] | *com familiares 1º grau: 7,2% |
| Hábitos tabágicos | *prevalência sim 65,5% * sig < 0,001, OR= 2,90, IC= [1,97; 4,27] | *Sim 39,6 % |
| Cessaçãotabágica | *prevalência “a < 1 ano” 71,8% * sig < 0,001, OR= 5,33 , IC= [2,76; 10,27] | *prevalência “entre [1; 15] anos” 67,6% |
| Hábitos alcoólicos | *prevalência sim 65,9% * sig= 0,002, OR= 1,9 , IC= [1,21; 2,84] | *Sim 50,4 % |
| Fumadores c/ hábitos alcoólicos | *prevalência sim 82,6% * sig < 0,001, OR= 4,5 , IC= [2,42; 8,56] | *Sim 51,1 % |

b) Nas distribuições das frequências genotípicas.

| Genótipos | População de doentes | População controlo |
|---|---|---|
| <p><i>CYP1A1</i>*2A, <i>CYP1A1</i>*2C</p> | <p>*individualmente sig>0,005 *sub-populações prevalentes: <i>CYP1A1</i>*2A(<i>T/T</i>)/<i>CYP1A1</i>*2C(<i>A/A</i>)(68,8%); <i>CYP1A1</i>*2A(<i>T/T</i>)/<i>CYP1A1</i>*2C(<i>A/G</i>) (11,6%) *subpopulação: -<i>CYP1A1</i>*2A(<i>T/T</i>)/<i>CYP1A1</i>*2C(<i>A/A</i>) com sig<0,005 para sexo (masculino 54,9%); consumo álcool (sim 54,2%); hábitos tabágicos (fumador 79,7%); cessação tabágica (“a<1 ano”79,7%); história familiar (sim 83,3%) - <i>CYP1A1</i>*2A(<i>T/T</i>)/<i>CYP1A1</i>*2C(<i>A/G</i>) consumo álcool (sim 57,7%); hábitos tabágicos (fumador 76,9%); *sem associação (sig<0,05) com variáveis clínicas, individualmente ou combinados; *grupo de fumadores: subpopulação <i>CYP1A1</i>*2A(<i>T/T</i>)/<i>CYP1A1</i>*2C(<i>A/A</i>) com sig<0,05 para estadio (estadio IV:79,3%)</p> | <p>*individualmente sig>0,005 * sub-população prevalente: <i>CYP1A1</i>*2A(<i>T/T</i>)/<i>CYP1A1</i>*2C(<i>A/A</i>),(59,4%) <i>CYP1A1</i>*2A(<i>T/T</i>)/<i>CYP1A1</i>*2C(<i>A/G</i>), (14,3%)</p> |

| | | |
|--|--|---|
| <p><i>CYP1A1 *2A,</i> <i>CYP1A1 *2C,</i> <i>CYP2D6*4</i></p> | <p>*prevalência individual (A/A, 12,5%) no sexo feminino, sig= 0,017</p> <p>*sub-populações prevalentes: <i>CYP1A1 *2A(T/T)/CYP1A1 *2C(A/A)/CYP2D6*4 (G/G) (51,1%)</i>) com sig<0,005 para sexo (feminino73,3%); consumo álcool (sim 42,0%); hábitos tabágicos (fumador 61,0%); cessação tabágica (“a<1ano”77,8%); história familiar (sim 64,3%)</p> <p><i>CYP1A1 *2A(T/T)/CYP1A1 *2C(A/A)/CYP2D6*4 (G/A)(19,7%)</i> com sig<0,005 para consumo álcool (sim 61,1%); hábitos tabágicos (fumador 65,6%);</p> <p>* com variáveis clínicas, com hábitos tabágicos: subpopulação</p> <p>- <i>CYP1A1 *2A(T/T)/CYP1A1 *2C(A/A) /CYP2D6*4(G/G)</i> com sig<0,05 para histologia</p> <p>-<i>CYP1A1 *2A(T/T)/CYP1A1 *2C(A/A)/ CYP2D6*4(G/A)</i>) com sig<0,05 para metastização e estadio</p> <p>- modelo de regressão logística com“acetilador lento”, GSTs, sexo e hábitos alcoólicos, sig<0,005</p> | <p>*genótipo (A/A) no sexo feminino 2,4%</p> <p>*sub-populações prevalentes: <i>CYP1A1 *2A(T/T)/CYP1A1 *2C(A/A)/CYP2D6*4(G/G) (40,1%)</i> <i>CYP1A1 *2A(T/T)/CYP1A1 *2C(A/A)/CYP2D6*4(G/A)(22,3%)</i></p> |
| <p><i>GSTP1/GSTT1/GSTMI</i></p> | <p>*prevalência individual com sig<0,005 GSTT1(-) (33,3%) na pop., <i>GSTP1(G/G)</i>, 27,5% no sexo feminino, <i>GSTT1 (-)</i>,(33,6%) no sexo masculino</p> <p>*<i>GSTP1</i> sig<0,005 e variáveis clínicas: histologia em fumadores, do sexo masculino;</p> <p>*modelo de regressão logística, sig<0,005, indica:</p> <p>-combinação <i>GSTP1(A/G)/GSTT1(-)/GSTMI (+)</i> , sexo masculino, consumidor álcool, OR=5,452</p> <p>- combinação <i>GSTP1(A/A)/GSTT1(-)/GSTMI (+)</i> , sexo masculino, consumidor álcool, OR=3,268</p> <p>-modelo de regressão logística com“acetilador lento”, CYPs, sexo e hábitos alcoólicos, sig<0,005</p> | <p>*prevalência para: <i>-GSTP1(A/G)/GSTT1(+)/GSTMI (+)</i>(27,2%)</p> |
| <p><i>NAT2</i></p> | <p>*prevalência para acetiladores lentos (83,8%) sexo masculino, sig<0,005</p> <p>*subpopulação Acetilador lento, sig<0,005 para sexo masculino (52,4%), história familiar (76,8%), hábitos tabágicos (<0,001), cessação tabágica “a <1 ano” (79,3%)</p> <p>*Variáveis clínicas sig<0,005 para histologia, metastização</p> <p>*modelo de regressão , sig<0,005, com “acetilador</p> | <p>*prevalência para “acetiladores rápidos” para ambos os sexos,</p> |

| | | |
|------|--|--|
| | <p>lento” e cessação tabágica e “acetilador lento” OR= 4,5</p> <p>*modelo de regressão logística com “acetilador lento”, GSTs, CYPs, sexo e hábitos alcoólicos, sig<0,005</p> | |
| TP53 | <p>*prevalência de TP53 mutada no sexo masculino</p> <p>*modelo de regressão logística para TP53 mutada e localização tumor, sig<0,005</p> <p>*combinação <i>GSTP1</i>/TP53 e localização do tumor, sig<0,005</p> <p>*modelo de regressão logística indica: <i>GSTP1</i>(A/G)/TP53(+) OR=6,2; <i>GSTP1</i>(A/G)/TP53(-) OR=3,7 para localização do tumor</p> | |

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Alberg A, Samet J, Epidemiology of lung cancer. *Chest-The cardiopulmonary and critical care journal* (2006), 123:21-49.

Amjad Mahasneh A, Amal Jubaili A, El Bateiha A, Al-Ghazo M, Al-Ghazo I, Malkawi M, Polymorphisms of arylamine N-acetyltransferase 2 and risk of lung cancer and colorectal cancer, *Genetics and Molecular Biology* (2012), 35, 4, 725-733.

Bartsch H, Petruzelli S, Flora S, Hietanen E, Camus A, Castegnaro M, Alexandrov K, Rojas M, Saracci R, Giuntini C. Carcinogen Metabolism in Human Lung Tissues and the Effect of Tobacco Smoking: Results from a Case-Control Multicenter Study on Lung Cancer Patients. *Environmental Health Perspectives*, (1992) 98: 119-124,

Benedetti A, Parent m, Siemiatycki, Consumption of alcoholic beverages and risk of lung cancer. Results from two case-control studies in Montreal, Canada. *Cancer, causes, control* (2006) 17:469-480.

Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie A, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, et al. Meta and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk *Carcinogenesis*(2002),23(8):1343-1350.

Benjamin Lewin, (1994). *Genes V*. Oxford University Press

Berkson's Bias, Selection Bias and Missing Data, *Epidemiology* 2012 January; 23 (1): 159-164.

Bertram J, Rogers A, Recovery of bronchial epithelium on stopping smoking. *British medical Journal* (1981) 283:1567-1569.

Bio Rad. Real-time PCR. Applications Guide. ©Bio-Rad Laboratories, Inc.

- Biological Research Product, Protocols and Application, Promega.
- Biological Research Product, Protocols and Application, Promega.
- Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M,C, Meyer D.M,. DNA and Cell Biology. (1990), 9(3): 193-203. doi:10.1089/dna.1990.9.193.
- Božina N, Bradamante V, Lovric M, Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol* (2009) 60:217:242-256.
- Board P, Menon D, Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica and Biophysica Acta* 1830 (2013),3267-3288.
- Borlak J, Reamon-Buettner SM, N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in colon and lung patients. *BMC Medical Genetics* (2006), 7:58.
- Butcher LD e Boland CR. Tumour Formation: Number of Mutations Required. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2012.
- Butkiewicz D, Grybowska E, Phillips D, Hemminki K, Chorazy M, Polymorphisms of GSTP1 and GSTM1 genes and PAH-DNA adducts in human mononuclear white blood cells. *Environmental and molecular mutagenesis* (2000), 35:99-105.
- Byers T, Vena J, Rzepka T, Predilection of lung cancer for the upper lobes: an epidemiologic inquiry. *JNCI* (1984)72:1271-1275.
- Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. TP53 and KRAS Mutation Load and Types in Lung Cancers in Relation to Tobacco Smoke: Distinct Patterns in Never, Former, and Current Smokers. *Cancer Res* 2005; 65: 5076-5083.
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA, (2003) Additional SNPs and linkage-desiilibrium analyses are necessary for whole genome association studies in humans. *Nat. Genet*; 33:518-521.
- Cascorbi I, Brockmüller J, Przemyslaw M, Baeur S, Loddenkemper R, Roots I, Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Research* (1996) 56, 3961-3966.

- Caulin AF e Maley CC. Peto's Paradox: Evolution's Prescription for Cancer Prevention. *Trends Ecol Evol* (2011)26:175–182.
- Correia C, Santos P, Coutinho AM, Vicente AM, Characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6 and ABCB1 gene polymorphisms in a Portuguese population sample. *Cell Biochem and Funct* (2009); 27: 251-255.
- Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F e Souquet P-J. Lung cancer in never smokers – A review. *Eur J Cancer* (2012); 48: 1299-1311.
- Danesi R., Di Paolo A., Bocci G., Crea F., Del Tacca M., Pharmacogenetics in oncology, *EJC Supplements* (2008) 6,74-78.
- Deeken JF, Figg DW, Bates Se, Sparreboom A, Towards individualized treatment: prediction of cancer drug disposition and toxicity with pharmacogenetics. *Anticancer Drugs*. (2007) 18;111-126.
- DeMarini DM, genotoxicity to tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review, *Mutation research* (2004) 567:447-474.
- Den Boer, M. L., Pieters, R., Kazemier, K. M., Janka-Schaub, G. E., Henze, G., Creutzig, U., Kaspers, G. J. L., Kearns, P. R., Hall, A. G., Pearson, A. D. J. and Veerman, A. J. P. (1999), Different expression of glutathione S-transferase α , μ and π in childhood acute lymphoblastic and myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 104: 321–327. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01189.x
- Disponível em: The TP53 web site. <http://p53.free.fr/index.html>
- Doll R e Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung preliminary report. *Br Med J* (1950) 2:739–48..
- Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* (2000), 100. 57-70
- Economou P, Samet JM, Lechner JF. Familial and genetic factors in the pathogenesis of lung cancer. In: Samet JM, ed. *Epidemiology of Lung Cancer*. New York : Marcel Dekker, Inc., (1994) 353-96.

- Egger T, Dormann H, Ahne G, Pahl A, Runge U, Azaz-Livshits T, Neubert A, Criegee-Rieck M, Gassmann KG, Brune K. Cytochrome p450 polymorphisms in geriatric patients: impact on adverse drug reactions--a pilot study. *Drugs Aging*.(2005);22(3):265-72.
- Ferlay J, Shin H-R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* (2010); 127:2893–917.
- Ferlay J, Steliarova-foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012, *European journal of cancer* (2013) 49, 1374-1403.
- Flanders WD, Lally C, Zhu BP, Henley SJ, Thun MJ, Lung cancer mortality in relation to age, duration of smoking, and daily cigarette consumption: results from cancer prevention study II, *Cancer Research* (2003) 63, 6556-6562.
- Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD, molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* (2003) 58:892-900.
- Freed-Pastor WA, Prives C, Mutant p53:one name, many proteins. *Genes & Development* (2012) 26:1268-1286.
- Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera EV, van den Brandt P, Colditz G, Feskanich D, Goldbohm RA, Harnack L, Miller A, Rimm E, Rohan T, Sellers T, Virtamo J, Willett W, Hunter D, Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr* (2005)82:657– 67.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie A, Ambrosone C, Autrup H, Autrup J, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper M, Coutelle C, Daly A, Dell’Omo M, Dolzan V, Dresler C, Fryer A, Haugen A, Hein D, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh L, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner M, van Lieshout E, London S, Manni J, Maugard C, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl F, Pastorelli R, Persson I, Peters W H M, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields P G, Sim E, Sinnet D, Strange R C, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu M, Taioli E, Metabolic Gene

Polymorphism Frequencies in Control Populations, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, (2001) 10: 1239–1248.

Gasche Y., Daali Y, Pharm.D., Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, Desmeules J, Codeine Intoxication Associated with Ultrarapid CYP2D6 Metabolism. *New Engl J Med* (2004) 351:27

Gill JP, Lechner MC, Increased frequency of wild-type arylamine-N-acetyltransferase allele NAT2*4 homozygotes in Portuguese patients with colorectal cancer. *Carcinogenesis* (1998),19 (1): 37-41.

Gough, A. C., Miles, J. S., Spurr, N.K., Moss, J. E., Gaedigk, A., Eichelbaum, M., Wolf, C.R. (1990). Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. Reprinted from *Nature*, Macmillan Magazines Ltd. 347:773-776.

Gresner P, Gromadzinska J, Wasowicz W, Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer* (2007), 57: 1-25.

Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGroven P, Delongchamp R, Kadlubar F. Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* (1999), 8. 683-692.

Grzybowska E, Butkiewicz D, Motykiewicz G, Choray M, The effect of the genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTP1 on aromatic DNA adduct levels in the population of healthy women. *Mutation Research* (2000)469:271-277.

Hayashi S., Watanabe J., Nakachi K., Kawajiri K., (1991), Genetic Linkage of lung cancer- associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 IA1 gene. *J. Biochem.*110, 407-411.

Hayes JD, Stange RC, Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences-. *Pharmacology* (2000) 61:154-166.

- Hayes JD, Stange RC, Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences-. *Pharmacology* (2000) 61:154-166.
- Hecht SS, Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, *Nature reviews* (2003), 3:733-743.
- Hein DW, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene* (2006) 25, 1649-1658.
- Hemmingsen A, Fryer A, Hepple M, Strange R, Spituri A, Simultaneous identification of GSTP1 Ile105→Val105 and ala114→Val114 substitutions using an amplification refractory mutation system polymerase chain reaction assay: studies in patients with asthma. *Respir. Res.* (2001) 2:255-260.
- Higgins L, Hayes J, Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug metabolism reviews.* (2011);43(2):92-137.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R.(1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 10:413-417.
- Horta M. Polimorfismos dos genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1 e susceptibilidade para o cancro do pulmão. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2010.[consult 13-2-20010].
- Hrubec Z, McLaughlin JK. Former cigarette smoking and mortality among U.S. veterans: a 26-year follow-up, 1954–1980. In: Burns JM, Garfinkel L, Samet JM, editors. *Monograph 8: Changes in Cigarette-Related Disease Risks and Their Implications for Prevention and Control.* Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1996. pp. 501–527.
- Hung R, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper M, Garte S, Haugen A, Hirvonen A, Antilla S, Kalina I, Le Marchand L, London S, Rannug A, Romkes M, Salagovic J, Schoket B, Gaspari L, Taioli E. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis* (2003), 24 (5):875-882.

- IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human (2013).
(monographs.iarc.fr/ENG/classification)
- In Hayat, MA, Methods of diagnosis, therapy and prognosis, Springer 2008. ISBN
14020844209781402084423. pp75-92.
- Ingelman-Sundberg M, Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6):
clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity.
Pharmacogenomics J (2005); 5(1): 6-13.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of
cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic,
pharmacoepigenetic and clinical aspects. Pharmacology and Therapeutics
(2007)116:496-526.
- Inskip A, Elexperu-Camiruaga J, Buxton N, Dias PS, MacIntosh J, Campbell D, Jones
PW, Yengi L, Talbot JA, Strange RC. Identification of polymorphism at the
glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A.
Biochem. J. (1995) 312 ;713–716.
- Invitrogene, Life technologies. Catalog for restriction enzymes.
- Jain M, Kumar S, Rastogi N, Ial P, Ghoshal UC, Tiwari A, Pant MC, Baiq MQ, Mittal
B. *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* genetic polymorphisms an interaction with
tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from
North India. Cancer Letters (2006) 242: 60-66.
- Jain M, Kumar S, Rastogi N, Ial P, Ghoshal UC, Tiwari A, Pant MC, Baiq MQ, Mittal
B. *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* genetic polymorphisms an interaction with
tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from
North India. Cancer Letters (2006) 242: 60-66.
- Janssen-Heijnen MLG, Coebergh J, The changing epidemiology of lung cancer in
Europe, Lung Cancer, (2003), 41:245-258.
- Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic Polymorphism and Toxicology—With
Emphasis on Cytochrome P450, Toxicological Sciences (2011) 120(1), 1–13

- Jones S, Chen W, Parmigiani G et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Nat Acad Sc USA* (2008); 105: 4283–4288.
- Kawajiri K, Eguchi H, Kei Nakachi, Sekiya T, Yamamoto M. Mutations of the p53 Gene in Lung Cancer. *Cancer Res* (1996); 56:72-76.
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, et al. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450 1A1 gene. *FEBS Lett*, (1990) 263:131-133.
- Korte JE, Brennan P, Henley SJ, Boffetta P Dose-specific meta-analysis and sensitivity analysis of the relation between alcohol consumption and lung cancer risk. *Am J Epidemiol* (2002) 155:496-506.
- Le Marchand L, Guo C, Benhamou S, Bouchardy C, Cascorbi I, Clapper ML, Garte S, Haugen A, Ingelman-Sundberg M, Kihara M, Rannug A, Ryberg D, Stücker I: Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States). *Cancer Causes Control* (2003)14 (4):339-46.
- Lee BW, Wain J, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani D, Association between diet and lung cancer location, *Am j Respir Care Med* (1998) 158: 1197-1203.
- Leite-Moreira AF, Roncon-Albuquerque JR R, Polimorfismos genéticos e risco de acidente vascular cerebral. *Ver Port Cardiol* (2003); 23(3):359-362.
- Lemos MC, Cabrita FJ, Silva H, Vivan M, Plácido F, Regateiro FJ, Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT 2 and susceptibility to haematological neoplasias, *Carcinogenesis* (1999) 20: 1225-1229.
- Lemos MC, Coutinho E, Gomes L, Carrilho F, Rodrigues F, Regateiro FJ, Carvalheiro M Combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer. *J endocrinol Invest* (2008), 31 (6):542-545.
- Life Technologies (GibcoBRL) catalog for restriction enzymes.
- López-Cima MF, Alvarez-Avellón S, Pascual T, Fernández-Somoano A, Tardón A, Genetic polymorphisms in *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* metabolic genes and risk of lung cancer in Asturias. *BMC Cancer* (2012) 12:433.

- M. Fatih Okeu, Selvan M., Wang Li-E, Stout L., Erana R., Airewele G., Adatto P., Hess K., Ali-Osman F., Groves M., Yung A. W. K., Levin V. A., Wei Q., Bondy M., (2004). Glutathione S-Transferase polymorphisms and survival in primary malignant glioma, 10:2618-2625.
- Mackinnon A, Kopatz J., Sethi T, The molecular and celular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies, British Medical Bulletin (2010) 95:47-61.
- Matakova T, Sivonova M, Halasova E, Mistuna D, Dzian A, Berzinec B, Letkova L, Dobrota D. Gene polymorphism of biotransforming Enzymes (GSTs) and their association with Lung Cancer in the Slovakian Population. Eur J.Med. Res.(2009) 14 (Suppl.IV) 275:279.
- Miller SA, Dykes DD, polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16(3), 1215.
- Minna JD, Gazdar A., Focus on Lung Cancer. Cancer Cell (2002),1:49.
- Mogi A., Kuwano H.,Tp53 mutations in Nonsmall cell lung cancer. J. Biomed. and Biotech. (2011) Article ID 583929.
- Moreira A, Martins G, Monteiro MJ, Alves M, Dias J, Costa JD, Melo J, Matias D, Costa A, Cristóvão M, Rueff J, Monteiro C. Glutathione S-Transferase Um Polymorphism and Susceptibility to Lung câncer in the Portuguese Population. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis (1996) 16: 269-274.
- Mota P, Moura D, Vale M, Coimbra H, Carvalho L, Regateiro F, *CYP1A1 m1* and *m2* polymorphisms: genetic susceptibility to lung cancer,Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition) 2010, 16: 89-98.
- Mota P, Reino A, Regateiro FJ, Pego A, Martins A, Sousa A, Loureiro M, Cristovão M, Costa A, Melo MJ, Santos AA e Cordeiro AR. Frequência genótipica e alélica do polimorfismo de gene *CYP2D6* do citocromo P450 na população portuguesa normal e com cancro do pulmão, Via Pneumológica (1995)VII:21-28.
- Mullis, K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American (1990)April 56-65.

- Murio M, Marín L, Torio A, Moya-Quiles M, Minguela A, Rosique-Roman J, Sanchis M, Garcia-Calatayud M, Garcia-Alonso A, Alvarez-Lopez M, HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): In the cradle of the archaeological Iberians, *Human Immunology*, (2001) 62, 910-921.
- Nacak M, Aynacioglu AS, Filiz A, Cascorbi I, Erdal ME, Yilmaz N, Ekinçi E, Roots I. Association between the *N*-acetylation genetic polymorphism and bronchial asthma, *Br J Clin Pharmacol*, 54, 671-674.
- Nakachi K, Hayashi S, Kawajiri K, Imai K. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis* (1995) 16:2209-2213.
- Nakachi, K., Imai K., Hayashi S., Watanabe J., Kawajiri K.. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Research*.(1991) 51, 5177-5180.
- Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, Sonowane B, Genetic polymorphism in cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*); population distribution of *CYP2D6* activity. *Journal of toxicology and Environmental Health, Part B*, (2009) 12:334-361.
- Nebert D, Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *AM J. Human Genetic* (1997), 60: 265-271.
- Nogueira A, Catarino R, Coelho A, Araújo A, Gomes M, Medeiros R, "Influence of DNA repair RAD51 gene variants in overall survival of non-small cell lung cancer patients treated with first line chemotherapy", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2009) 66,3:501-506 doi: [10.1007/s00280-009-1187-2](https://doi.org/10.1007/s00280-009-1187-2)
- Norppa H, Cytogenetic Markers of Susceptibility: Influence of Polymorphic Carcinogen-metabolizing Enzymes. *Environmental Health Perspectives* (1997) 105:829-835.
- Nyberg F., Hou SM, Hemminki K, Lambert B, Pershagen G. glutathione S-transferase Mu1 and N acetyl transferase 2 genetic polymorphisms and exposure to tobacco smoke in non-smoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Cancer epidemiol biomarkers Prev.* (1998) 7 (10): 875-83.

- Omicinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities, *Toxicological Sciences* (2011)120(S1), S49-S75. doi:10.1093.
- Oren M, Rotter V, Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring harbor Perspectives in Biology* (2010)2:a001107.
- Oyama T, Sugio K, Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, Isse T, Nozoe T, Kagawa N, Yasumoto K, Kawamoto T, Increased cytochrome P450 and aryl hydrocarbon receptor in bronchial epithelium of heavy smokers with non-small cell lung carcinoma carries a poor prognosis. *Frontiers in Bioscience* (2007) 12, 4497-4503.
- Parente B. Queiroga H, Teixeira E, Sotto-Mayor R, Barata F et al, Estudo epidemiológico do cancro do pulmão nos anos 2000/2002, *Revista portuguesa de pneumologia*, (2007) 13(2):255-265.
- Parson A, Daley A, Begh R, Aveyard P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ* (2010);340:b5569.
- Peluso M., Neri M., Margarino G., Mereu C., Munnia A., M. Ceppi M., Buratti M., Felletti R., Stea F., Quaglia R., Puntoni R., Taioli E., Garte S., Bonassi S. Comparison of DNA adduct levels in nasal mucosa, lymphocytes and bronchial mucosa of cigarette smokers and interaction with metabolic gene polymorphisms. *Carcinogenesis*(2004) vol.25 no.12 pp.2459—2465.
- Perwez Hussain S, Hollstein H, Curtis C, Harris A p53 Tumor Suppressor Gene at the Crossroads of Molecular Carcinogenesis, *Molecular Epidemiology, and Human Risk Assessment*, *Annals of the New York academy of Sciences*, (2006)919.
- Pestana M, Gageiro J, *Análise de dados para ciências sociais. A complementaridade do SPSS*, 5ª ed. Lisboa, Editora Sílabo, 2008. ISBN 978-972-618-498-0.
- Peto R, Influence of dose and duration of smoking on lung cancer rates, *IARC Sci*(1986);74:23-33.

- Pfeifer Gerd P', Denissenko MF, Tang M p53 mutations, benzo[a]pyrene and lung cancer: a reply *Mutagenesis*,(1998) 13(6):537-538
- Pliarchopoulou K, Voutsinas G, Papaxoinis G, Florou K, Skondra M, Kostaki K, Roussou P, Syrigos K, Pectasides D. Correlation of *CYP1A1*, *GSTP1* and *GSTM1* gene polymorphisms and lung cancer risk among smokers. *Oncology Letters* (2012) 3: 1301-1306.
- Pliarchopoulou K, Voutsinas G, Papaxoinis G, Florou K, Skondra M, Kostaki K, Roussou P, Syrigos K, Pectasides D. Correlation of *CYP1A1*, *GSTP1* and *GSTM1* gene polymorphisms and lung cancer risk among smokers. *Oncology Letters* (2012) 3: 1301-1306.
- Pliarchopoulou K, Voutsinas G, Papaxoinis G, Florou K, Skondra M, Kostaki K, Roussou P, Syrigos K, Pectasides D. Correlation of *CYP1A1*, *GSTP1* and *GSTM1* gene polymorphisms and lung cancer risk among smokers. *Oncology Letters* (2012) 3: 1301-1306.
- Regateiro Fernando, Manual de Genética Médica, 1ª Edição, Imprensa da Universidade de Coimbra, 2003, ISBN 972-8704-12-7, pp 41-65.
- Risch A, Plass C, Lung cancer epigenetics and genetics *Int. J. Cancer* (2008): 123, 1-7.
- Risch N, The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev*,(2001) 10: 733-741.
- Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M, Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* (2006) 25:1679-1691.
- RON 2006-Registo Oncológico Nacional 2006-Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil, EPE-Lisboa-2012(ISSN 978-989-95380-3-0). (RORENO. Registo Oncológico Regional do Norte 2006. Instituto Português de Oncologia do Porto); (ROR Centro 2006/2009/2013); (ROR SUL 2006/2009/20013).
- Rossiter, B.J.F., Caskey, C. T. (1993). *Molecular Diagnostics*. Blackwell Scientific Publication

- Rotunno M, Lam TK, Vogt A, Bertazzi PA, Lubin JH, Caporaso NE, Landi MT. *GSTM1* and *GSTT1* Copy Numbers and mRNA Expression in Lung Cancer. *Molecular Carcinogenesis* (2012) 51: E142-E150.
- Rusin M, D Butkiewicz D, E Malusecka E, Zborek A, Harasim J, Czyzewski K, Bennett WP, Shields PG, Weston A, Welsh JA, Krzyzowska-Gruca S, Chorazy M, Harris CC. Molecular epidemiological study of non-small-cell lung cancer from an environmentally polluted region of Poland. *British Journal of Cancer* (1999) 80(9), 1445–1452
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I, Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* (1997); 60 (2): 284-95.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sams C, Mason HJ, Rawbone R, Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicol. Lett.* (2000) 116:217-221.
- San Jose C, Cabanillas A, Benitez J, Carrillo JA, Jimenez M, Gervasini G. *CYP1A1* gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer* (2010), 10: 463.
- Sark RK, Gelford DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 29 (1988), 238(4839):487-491.
- Shah P, Singh A, Singh M, Mathur N, Pant M, Mishra N, Parmar D, Interaction of cytochrome P4501A1 genotypes with other risk factors and susceptibility to lung cancer. *Mutation Research* (2008)639:1-10.
- Shimada T, Fujii-Kuriyama Y., Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* (2004) 95 (1) 1-6.

- Singh S, Kumar V, Singh P, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Rai A. Genetic polymorphisms of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutation Research* 725 (2011) 36-42.
- Smith C., Wadelius M., Gough A., Harrison D., Wolf C., Rane A., A simplified assay for the aryllamine N-acetyltransferase 2 polymorphism validated by phenotyping with isoniazid. *J. Med. Genet.*(1997) 34; 758-760.
- Song N, Tan W, Xing D, Lin D, CYP1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China, *Carcinogenesis* (2001) 22:11-6.
- Sørensen M, Raaschou-Nielsen O, Brasch-Andersen C, Tjønneland a, Overvad K, Autrup H. Interactions between *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms and smoking and intake of fruit, vegetables in relation to lung cancer. *Lung Cancer*, (2007) 55, 137-144.
- Special report: policy. A review of human carcinogens-Part F: Chemical agents and related occupations. IARC vol10,(2009) (www.thelancet.com/oncology).
- Spivack S, Hurteau G, Fasco M, Kaminsky L, Phase I and II carcinogen metabolism gene expression in human lung tissue and tumors. *Clinical cancer research* (2003), 9:6002-6011.
- Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, Madhavan J Devan SC, Ankathil R. Possible risk modification by CYP1A1, *GSTM1*, and *GSTT1* gene polymorphisms in lung cancer susceptibility in a South Indian population. *JHumGenet*(2005) 50:618-27.
- Strange R, Spiteri M, Ramfryer A, Glutathione S- Transferase family of enzymes. *Mutation research* 482 (2001)921-26.
- Suarez-Kurtz G, Vargens D, Sortica V, Hutz M, Accuracy of NAT2 SNP genotyping panels to infer acetylator phenotypes in African, Asian, Ameridian and admixed populations. *Pharmacogenomics* (2012)13(8), 851-854.
- Sweeney C, Farrow DC, Schwartz SM, Eaton DL, Checkoway H, Vaughan TL Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms as risk factors for renal

cell carcinoma: a case control study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* (2000) 9:449-454.

Taylor JA, Umbach DM, Stephens E, Castranio T, Paulson D, Robertson C, Mohler JL, Bell DA, . The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. *Cancer Res.* (1998) 15;58(16):3603-10.

Toledo, Frank,-Role of p53 Mutations in cancer (an overview). *General Methods and Overviews, Lung Carcinoma and Prostate Carcinoma Methods of Cancer Diagnosis, Therapy, and Prognosis Volume 2* (2008), pp 75-92 .

Torres MA, Jones JDG, Dangl JL Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*,(2006), 141, 373–37.

Tyczynski J. E., Bray F., Parki DM, Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection, *Lancet Oncol* (2003); 4: 45–55.

Uehara C, Jamnik S, Santoro IL, *Cancer do pulmão, Medicina, Ribeirão Preto* (1998), 31:266-276.

Vatsis K. P., Weber W. W., Bell D. A., Dupret J-M., Price-Evans D. A., Grant D. M., Hein D. W., Lin H. J., Meyer U. A., Relling M. V., Sim E., Suzuki T., Yamazoe Y. Nomenclature for *N*-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, (1995)5: 1-17,.

Vilar R, Coelho H, Rodrigues E, Gama MJ, Rivera I, Taioli E, Lechner MC. Association of A313 G polymorphism (GSTP1*B) in the glutathione-S-transferase P1 gene with sporadic Parkinson's disease. *Eur J Neurol*.2007 Feb;14(2):156-61.

Wauthier V. Verbeeck RK, Calderon B. The effect of ageing on cytochrome P450 enzymes: consequences for drug biotransformation in the elderly. *Current medicinal chemistry*(2007), 14,745-757.

Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular pharmacology* (2009), 76:215-228.

Wen J, Fu J, Zhang W, Guo M, Genetic and Epigenetic changes in Lung carcinoma and their clinical implications. *Modern Pathology* (2011) 24, 932-943.

- Windmill K, Gaedigk A, Hall P, Samaratunga H, Grant D, McManus M, Localization of N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues. *Toxicological Sciences* (2000)54,19-29.
- Wistuba I, Mao li, Gazdar A. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* (2002)21:7298-7306.
- Wolbold, R., Klein, K., Burk, O., Nüssler, A. K., Neuhaus, P., Eichelbaum, M., Schwab, M. and Zanger, U. M. (2003), Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*, 38: 978–988. doi: 10.1002/hep.1840380424.
- Wormhoudt LW, Commandeur NM, Vermeulen NPE, Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenibiotic metabolism and toxicity. *Criticals reviews in toxicology*, (1999), 29(1):59.
- Wright CN, Larsen JE, Colosimo ML, Barr JJ, Chen L, macLachlan RE, Yang IA, Bowman RV, Fong KM genetic association study of CYP1A1 polymorphisms identifies risk haplotypes in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* (2010), 35:152-159.
- Wu J, Sin D, Improved patient outcome with smoking cessation: when is it to late? *International Journal of COPD* (2011) 6:259-267.
- Hu X, Xia H, Srivastava KS, Herzog C, Awasthi YC, Ji X, Zimniak P, Singh SV, Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1997); 238(2):397-402.
- Ya-nan Ji' Qin Wang' Xin-qing Lin' Li-jun Suo' CYP1A1 MspI polymorphisms and lung cancer risk: An updated meta-analysis involving 20,209 subjects *Cytokine* (2012) 59:324-334.
- Yang P, Yokomizo A, Tazelaar HD, Marks RS, Lesnick TG, Miller DL, Sloan JA, Edell ES, Meyer RL, Jett J, Liu W, Genetic determinants of lung cancer short-term survival: the role of glutathione-related genes. *Lung Cancer*(2002), 35:221-229.

- Yang P, Yokomizo A, Tazelaar HD, Marks RS, Lesnick TG, Miller DL, Sloan JA, Edell ES, Meyer RL, Jett J, Liu W, genetic determinants of lung cancer short-term survival: the role of glutathione-related genes. *Lung Cancer*(2002), 35:221-229.
- Zamek-Gliszczyński M, Nezasa K, Tian X, Bridges AS, Lee K, Belinsky MG, Kruh, GD, Brouwer KLR., Evaluation of the Role of Multidrug Resistance-Associated Protein (Mrp) 3 and Mrp4 in Hepatic Basolateral Excretion of Sulfate and Glucuronide Metabolites of Acetaminophen, 4-Methylumbelliferone, and Harmol in *Abcc3*^{-/-} and *Abcc4*^{-/-} Mice. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* (2006), 319 (3) 1485-1491.
- Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P4502D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry, Naunyn Schmiedeberg's *Arch Pharmacol* (2004):23-37.
- Zhan P, Wang Q, Qian Q, S Wei S, Yu L, CYP1A1 MspI and exon7 gene polymorphisms and lung cancer risk: An updated meta-analysis and review, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2011), 30:99.
- Zhang JY, Wang Y, Pralcash C, Xenobiotic-metabolizing enzymes in human lung. *Curr Drug Metab* (2006) 7:939-48.
- Zhao Y, Marotta M, Eichler EE, Eng C, Tanaka H (2009) Linkage Disequilibrium between Two High-Frequency Deletion Polymorphisms: Implications for Association Studies Involving the *glutathione-S transferase (GST)* Genes. *PLoS Genet* 5(5): e1000472. doi:10.1371/journal.pgen.10004.

Anexos

ANEXO A

ANEXO A: Caracterização descritiva da população para a variável “Idade”.

Distribuição das idades das duas populações estudadas da população Portuguesa. Tabela das frequências absolutas e relativas. Estatística descritiva; Teste de aderência à normalidade, Kolmogorov-Smirnov.

Tabela A.1- Distribuição das idades pelas populações doente e controlo

| IDADE | Pop. Doente (%) | Pop. Controlo(%) | IDADE | Pop. Doente (%) | Pop. Controlo(%) |
|--------------|------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|-------------------------|
| 36 | 1 (0,5) | 0 (0,0) | 69 | 11 (5,5) | 7 (2,8) |
| 37 | 1 (0,5) | 0 (0,0) | 70 | 9 (4,5) | 10 (4,0) |
| 40 | 0 (0,0) | 1(0,4) | 71 | 5 (2,5) | 9 (3,6) |
| 41 | 1 (0,5) | 1(0,4) | 72 | 4 (2,0) | 5 (2,0) |
| 44 | 2 (1,0) | 0 (0,0) | 73 | 7 (3,5) | 9 (3,6) |
| 45 | 4 (2,0) | 1 (0,4) | 74 | 8 (4,0) | 10 (4,0) |
| 46 | 2 (1,0) | 0 (0,0) | 75 | 5 (2,5) | 7 (2,8) |
| 47 | 1 (0,5) | 0 (0,0) | 76 | 9 (4,5) | 9 (3,6) |
| 48 | 2 (1,0) | 0 (0,0) | 77 | 3 (1,5) | 7 (2,8) |
| 49 | 4 (2,0) | 1 (0,4) | 78 | 0 (1,0) | 11 (4,5) |
| 50 | 5(2,5) | 2(0,8) | 79 | 0 (0,0) | 5 (2,0) |
| 51 | 6(3,0) | 4 (1,6) | 80 | 1 (0,5) | 7 (2,8) |
| 52 | 1 (0,5) | 2(0,8) | 81 | 1 (0,5) | 9 (3,6) |
| 53 | 9 (4,5) | 2(0,8) | 82 | 2 (1,0) | 5 (2,0) |
| 54 | 2 (1,0) | 5 (2,0) | 83 | 1 (0,5) | 6 (2,8) |
| 55 | 6 (3,0) | 4 (1,6) | 84 | 2 (1,0) | 3 (1,2) |
| 56 | 6 (3,0) | 3 (1,2) | 85 | 0 (0,0) | 5 (2,0) |
| 57 | 8 (4,0) | 4 (1,6) | 86 | 0 (0,0) | 5 (2,0) |
| 58 | 6 (3,0) | 8 (3,2) | 87 | 1 (0,5) | 5 (2,0) |
| 59 | 5 (2,5) | 8 (3,2) | 88 | 0 (0,0) | 5 (2,0) |
| 60 | 10 (5,0) | 4 (1,6) | 89 | 0 (0,0) | 2 (0,8) |
| 61 | 9 (4,5) | 4 (1,6) | 90 | 0 (0,0) | 2 (0,8) |
| 62 | 4 (2,0) | 6 (2,4) | 91 | 0 (0,0) | 2 (0,8) |
| 63 | 5 (2,5) | 1 (0,4) | 93 | 0 (0,0) | 2 (0,8) |
| 64 | 6 (3,0) | 9 (3,6) | 97 | 0 (0,0) | 1 (0,4) |
| 65 | 7 (3,5) | 5 (2,0) | | | |
| 66 | 5(2,5) | 11 (4,5) | | | |
| 67 | 5 (2,5) | 6 (2,4) | | | |
| 68 | 5 (2,5) | 7 (2,8) | | | |
| TOTAL | | | | 200 (44,74%) | 247 (55,26%) |

A Tabela A.1 representa a distribuição das duas amostras da população estudada, controlo e doentes, em função das idades. O resultado do estudo estatístico da população na globalidade (N=447) é apresentado na Tabela A.2. A população possui uma média de idades de 67,40 anos (dp=11,295; variação= 36-97anos), com uma prevalência de indivíduos com 70 anos de idade. A distribuição do número médio de idades é simétrica, para $p=0,05$, sendo o valor do coeficiente de Skweness igual a -0,835. A média, média aparada a 5% e mediana, são medidas de tendência central que, devido há simetria da distribuição, apresentam valores muito próximos, respetivamente 67,40, 67,47 e 68,00. Muito embora a mediana, 68, se aproxime de um dos extremos do intervalo de confiança a 95%, [66,35; 68,45], pertence ao referido intervalo, o que nos permite inferir, pelo valor obtido do coeficiente de Skweness, que a nossa população tem uma distribuição normal, para um erro do tipo I do analista, $p=0,05$. O valor para a medida de achatamento da distribuição, coeficiente de Kurtosis, apresenta-se inferior a $|p|<1,96$, -1,94, pelo que se pode afirmar que a curva de distribuição é simétrica e mesocúrtica.

Tabela A.2. Estatística descritiva para a população portuguesa da zona Centro do país (n=447) - medidas de localização e tendência central, medidas de dispersão absolutas e distribuição normal.

| | Média de Idades | Intervalo de Confiança (95%) | Mediana | Média aparada a 5% | M o d a | Variância | Desvio Padrão | Coefic. de Skeweness | Coefic. de Kurtosis | Valor Min. e Máx. |
|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|---------|--------------------|---------|-----------|---------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| Idade da População (n=447) | 67,40 | [66,35;68,45] | 68,00 | 67,47 | 70 | 127,586 | 11,295 | -0,835 | -1,94 | 36; 97 |

A Tabela A.3 diz respeito à distribuição da população por quartis e percentis. Verifica-se que o primeiro quartil, 25% da população, corresponde a 179 indivíduos com idades compreendidas entre os 36 aos 59 anos. No segundo quartil ou mediana, correspondendo a 50% da população analisada, fazem parte indivíduos com idades até aos 68 anos enquanto que no último quartil estão compreendidos os indivíduos com mais de 76 anos, até aos 97 anos.

Tabela A.3 Análise das estatísticas de ordem para a distribuição etária da população global

| Percentis | “Média Pesada” Idades | “Turkey’s Hinges” Idades |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 5 | 49,00 | |
| 10 | 53,02 | |
| 25 | 59,00 | 59,00 |
| 50 | 68,00 | 68,00 |
| 75 | 76,00 | 76,00 |
| 90 | 82,00 | |
| 95 | 86,00 | |

As Tabelas A.4 e A.5 apresentam o estudo relativo à estatística descritiva das duas amostras populacionais, doentes e controlo, da população portuguesa da zona Centro do país.

A população de doentes (Tabela A.4) é mais jovem, média de idade de 63,06 anos ($dp=10,170$; amplitude amostral= 36; 87anos), do que a amostra da população controlo, com uma média de idades de 70,92 anos ($dp=11,243$; amplitude amostral= 40; 97anos). A população de doentes apresenta prevalência (moda) para indivíduos com 69 anos de idade, enquanto que a população controlo tem duas prevalências etárias, a primeira para os 66 anos e a segunda para os 78 anos. A distribuição do número médio de idades é simétrica para ambas as populações ($p=0,05$), com um valor para o coeficiente de Skewness igual a $-0,965$, para a população de doentes e de $-1,76$, para a população controlo. A média, média aparada a 5% e mediana, são medidas de tendência central que, devido à simetria da distribuição, apresentam valores muito próximos, respectivamente 63,06, 63,17 e 63, para amostra de doentes e 70,92, 71,06 e 71, para a amostra controlo (Tabela A.4). Pelos valores obtidos relativamente ao coeficiente de Skewness, podemos afirmar que as nossas amostras possuem uma distribuição normal, para um erro do tipo I do analista ($p=0,05$). A medida de achatamento da distribuição, coeficiente de Kurtosis, apresenta-se inferior a $|p|<1,96$, com os valores $-1,46$ e $-1,43$ para as amostras de doentes e controlo, respectivamente. As curvas de distribuição individuais apresentam-se simétricas e mesocúrticas.

Tabela A.4 Estatística descritiva para as duas populações, doentes e controlo, da zona Centro do país.

| | Média de Idades | Intervalo de Confiança (95%) | Mediana | Média para a 5% | Módulo | Variância | Desvio Padrão | Coefic. de Skeweness | Coefic. de Kurtosis | Valor Mín. e Máx. |
|---------------------------------------|-----------------|------------------------------|---------|-----------------|------------|-----------|---------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| Idade da Pop. Doentes (N=200) | 63,06 | [61,64;64,48] | 63 | 63,17 | 69 | 103,424 | 10,170 | -0,965 | -1,46 | 36; 87 |
| Idade da Pop. Controlo (N=247) | 70,92 | [69,55;72,29] | 71 | 71,06 | (66) 78 | 126,401 | 11,243 | -1,76 | -1,43 | 40; 97 |

Na Tabela A.5 está apresentada a distribuição por quartis e percentis das duas amostras da população, doentes (n=200) e controlo (n=247) em função das idades. A população de doentes, no primeiro quartil (25% da população) possui idades compreendidas entre os 36 e os 56 anos. O segundo quartil ou mediana, correspondente a 50% da população analisada, possui indivíduos com idades até aos 63 anos, no terceiro quartil estão compreendidos indivíduos com idades compreendidas entre os 63 anos aos 71,5 anos e no último quartil, fazem parte os indivíduos com idades entre os 71,5 e os 87 anos. A população controlo apresenta a seguinte distribuição etária relativa aos quartis: dos 40 anos aos 64 anos, para o primeiro quartil, até os 71 anos para o segundo quartil, no terceiro quartil estão os indivíduos com idades entre os 71 anos e os 79,5 anos e no último quartil estão os indivíduos com idades compreendidas entre os 79,5 anos e os 97 anos.

Esta distribuição evidencia claramente a idade avançada da população controlo relativamente à população de doentes.

Tabela A.5 Análise das estatísticas de ordem para a distribuição etária das amostras da população estudada, doentes e controlo.

| Percentis | “Média Pesada” Idades | | “Turkey’s Hinges” Idades | |
|------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|
| | Pop Doentes | Pop Controlo | Pop Doentes | Pop Controlo |
| 5 | 45,05 | 52,40 | | |
| 10 | 50,00 | 56,00 | | |
| 25 | 56,00 | 64,00 | 56,00 | 64,00 |
| 50 | 63,00 | 71,00 | 63,00 | 71,00 |
| 75 | 71,00 | 79,00 | 71,50 | 79,50 |
| 90 | 76,00 | 85,20 | | |
| 95 | 77,95 | 88,00 | | |

Anexos

ANEXO B

Neste anexo B estão incluídos alguns estudos de associação relativos às variáveis demográficas e de risco como sejam sexo, hábitos tabágicos, história familiar e consumo de álcool que, embora pertinentes, não foram incluídos no texto do capítulo II, relativo a Material e métodos (pag. 40).

Tabela B.1 Distribuição da população em função dos seus hábitos tabágicos, classificados como fumador e ex-fumador e após estratificação pelo sexo. Avaliação das associações por aplicação do teste do χ^2 ou Teste Exato de Fisher¹.

| Hábitos Tabágicos | Pop. Doente | Pop. Controlo | χ^2 (sig) |
|-------------------|-------------|---------------|--------------------|
| Fumador | 80 (40,0) | 27 (11,0) | 52,998 (<0,001) |
| Ex-fumador | 51 (25,5) | 70 (28,6) | |
| Não fumador | 69 (34,5) | 148 (60,4) | |

| Hábitos Tabágicos | Fumador | Ex-Fumador | Não Fumador | χ^2 (sig) |
|-----------------------------------|-----------|------------|-------------|-------------------------------|
| Sexo Masculino (N=303) | | | | |
| Pop Doente | 75 (50,4) | 48 (32,2) | 26 (17,4) | 49,942 (<0,001) |
| Pop Controlo | 22 (14,3) | 64 (41,6) | 68 (44,2) | |
| Sexo Feminino (N=142) | | | | |
| Pop Doente | 5 (9,8) | 3 (5,9) | 43 (84,3) | 1,053 ¹ (0,638) |
| Pop Controlo | 5 (5,5) | 6 (6,6) | 80 (87,9) | |

(1) Por aplicação do teste Exato de Fisher

Tabela B.2 Distribuição dos indivíduos das duas populações, em função dos antecedentes familiares, tendo em consideração os subgrupos populacionais relativos aos hábitos tabágicos. Avaliação da distribuição por aplicação do teste do χ^2 ou Teste Exato de Fisher¹.

| Subpopulação sem hab. tabag. | História familiar | | χ^2 (sig) OR;IC(95%) |
|---------------------------------|-------------------|------------|------------------------------|
| | Sim (%) | Não (%) | |
| Pop. Doentes | 18 (28,1) | 46 (71,9) | 11,68 (0,001) |
| Pop Controlo | 14 (9,7) | 131 (90,3) | 2,91 [1,55; 5,49] |
| Subpopulação com hab. tabag. | | | |
| Pop. Doentes | 40 (32,8) | 82 (67,2) | 24,94 (< 0,001) |
| Pop Controlo | 5 (5,2) | 91 (94,8) | 6,30 [2,58; 15,34] |

Tabela B.3 Distribuição dos indivíduos das duas populações, em função dos antecedentes familiares, tendo em consideração os subgrupos populacionais relativos ao sexo. Avaliação da distribuição por aplicação do teste do χ^2 ou Teste Exato de Fisher¹.

| Subpopulação Feminina | História familiar | | χ^2 (sig) OR;IC(95%) |
|---------------------------|-------------------|------------|------------------------------|
| | Sim (%) | Não (%) | |
| Pop. Doentes | 18 (36,7) | 31 (63,7) | 11,31(0,001) |
| Pop Controlo | 11 (12,4) | 78 (87,6) | 2,97[1,53;5,77] |
| Subpopulação Masculina | | | |
| Pop. Doentes | 40 (29,2) | 97 (70,8) | 30,32 (< 0,001) |
| Pop Controlo | 8 (5,2) | 146 (94,8) | 5,62 [2,73;11,59] |

Tabela B.4 Distribuição dos indivíduos das duas populações em função dos hábitos alcoólicos, e tendo em consideração os subgrupos populacionais relativos aos hábitos tabágicos. Avaliação da distribuição por aplicação do teste do χ^2 ou Teste Exato de Fisher¹.

| Hábitos alcoólicos | Pop. Doente | Pop. Controlo | χ^2 (sig) OR [IC] |
|--------------------|-------------|---------------|---------------------------|
| Sim | 120 (65,9) | 118 (50,4) | 10,056(0,002) |
| Não | 62 (34,1) | 116 (49,6) | 1,903 [1,21; 2,84] |

| Subpopulação sem hab. tabág. | Hábitos alcoólicos | | χ^2 (sig) OR;IC(95%) |
|---------------------------------|--------------------|-----------|------------------------------|
| | Sim (%) | Não (%) | |
| Pop. Doentes | 25 (37,3) | 42 (62,7) | 4,937 (0,087) |
| Pop Controlo | 70 (50,0) | 70 (50,0) | |
| Subpopulação com hab. tabág. | | | |
| Pop. Doentes | 95 (82,6) | 20 (17,4) | 23,576 (< 0,001) |
| Pop Controlo | 47 (51,1) | 45 (48,9) | 4,5 [2,42; 8,56] |

Anexos

ANEXO C

Neste anexo é apresentada a distribuição da população de doentes pelas respetivas características clínicas avaliadas e após estratificação pelo sexo.

Tabela C.1- Distribuição das frequências encontradas para as diversas características clínicas avaliadas na população de doentes e após estratificação pelo sexo.

| Característica | Pop. doentes (%) | População Doentes | |
|--|---------------------|-----------------------|----------------------|
| | | Sexo masculino (%) | Sexo feminino (%) |
| Bilateralidade | | | |
| Sim | 32 (16,9) | 26 (18,6) | 6 (12,2) |
| Não | 157 (83,1) | 114 (81,4) | 43 (87,8) |
| Multifocalidade | | | |
| Sim | 33 (18,1) | 26 (19,4) | 7 (14,6) |
| Não | 149 (81,9) | 108 (80,6) | 41 (85,4) |
| Histologia do tumor | | | |
| Carc. pequenas células | 43 (22,5) | 34 (23,9) | 9 (18,4) |
| Carc.epidermóide | 50 (26,2) | 46 (32,4) | 4 (8,2) |
| Adenocarcinoma | 81 (42,4) | 49 (34,5) | 32 (65,3) |
| Carc. pleomórfico | 13 (6,8) | 10 (7,0) | 3 (6,1) |
| Outros (Carc. neuroendócrino, Carc.adenoescamoso) | 4 (2,1) | 3 (2,1) | 1 (2,0) |
| Localização do tumor | | | |
| Lobo superior, pulmão esq.dir. | 80 (65,0) | 59 (65,6) | 21 (63,6) |
| Lobo inferior, pulmão esq. dir. | 43 (35,0) | 31 (34,4) | 12 (36,4) |
| Estadio | | | |
| Até IIIA | 17 (13,5) | 12 (12,2) | 5 (17,9) |
| IIIB | 14 (11,1) | 9 (9,2) | 5 (17,9) |
| IV | 95 (75,4) | 77 (78,6) | 18 (64,3) |
| Metastização | | | |
| Sim | 76 (39,2) | 61 (41,8) | 15 (31,3) |
| Não | 118 (60,8) | 85 (58,2) | 33 (68,8) |
| Terapêutica citostática | | | |
| Sim | 190 (98,4) | 142 (98,6) | 48 (98,0) |
| Não | 3 (1,6) | 2 (1,4) | 1 (2,0) |
| Sobrevivência | | | |
| <2 anos | 52 (63,4) | 38 (62,3) | 14 (66,7) |
| >2 anos | 30 (36,6) | 23 (37,7) | 7 (33,3) |

Anexos

ANEXO D

Neste anexo é apresentada a distribuição da população controle pelas respectivas características clínicas avaliadas e após estratificação pelo sexo.

Tabela D.1- Distribuição das características associadas ao estado clínico da população controle e após estratificação pelo sexo.

| Caraterísticas | Pop. Controle | | |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Freq.Absoluta (%) | Sexo masculino (%) | Sexo feminino (%) |
| Razão do internamento (N=227) | | | |
| DPOC ¹ | 30 (12,4) | 19 (12,4) | 11 (12,1) |
| Insuficiência respiratória ² | 146 (59,8) | 91 (59,5) | 55 (60,4) |
| Infeção pulmonar | 61 (25,0) | 38 (24,8) | 23 (25,3) |
| Silicose | 3 (1,2) | 3 (2,0) | - |
| Fibrose pulmonar idiopática | 4 (1,6) | 2 (1,3) | 2 (2,2) |

¹ DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica)

² Insuficiência respiratória é uma categoria da variável “razão do internamento” que compreende todos os indivíduos que deram entrada no Serviço de Pneumologia, dos HUC, no período a que diz respeito este trabalho, e a quem foi diagnosticada uma das seguintes patologias: insuficiência cardio-respiratória, asma/bronquite, enfisema pulmonar, dispneia.