

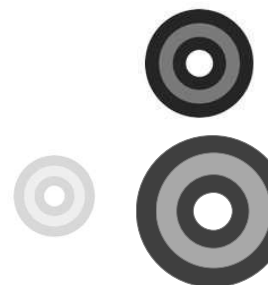
**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS
GENES *GSTM1*, *GSTT1* E *CYP1A1* EM
CÂNCERES MAMÁRIOS ESPORÁDICOS**

CLARISSA TORRESAN

Dissertação de Mestrado

CURITIBA

2006



CLARISSA TORRESAN

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES
GSTM1, GSTT1 E *CYP1A1* EM CÂNCERES
MAMÁRIOS ESPORÁDICOS

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre em Genética pelo
curso de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal
do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Iglênir João
Cavalli

Co-orientadora: Profa. Dra. Enilze
Maria de Souza
Fonseca Ribeiro

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

É com grande satisfação que escrevo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, me ajudaram a alcançar mais esta etapa da minha vida. Obrigada a todos vocês:

Ao *Prof. Dr. Iglénir João Cavalli* e a *Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro*, pela oportunidade e orientação conferida, além da amizade e apoio.

À *Profa. Dra. Valéria Maria Sperandio Roxo* por fazer parte da banca de acompanhamento e à *Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza* e ao *Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo* por participarem da minha banca de defesa. Obrigada por terem aceitado analisar e avaliar este trabalho. Minha grande admiração e sincera amizade.

À *Prof. Dra. Roseli Wassem*, pela ajuda especial na parte laboratorial.

A todos os indivíduos e instituições envolvidos neste estudo, sobretudo ao *Dr. Rubens S. Lima*, cuja ajuda foi fundamental para realização deste trabalho. Ao Hospital Nossa Senhora das Graças, Hospital de Clínicas de Curitiba, Universidade Estadual de Londrina, Universidade Federal do Paraná, Asilo Maria Teresa, aos seus professores e funcionários, que contribuíram com seu auxílio, conhecimento e infraestrutura.

Às mulheres que, como pacientes ou controles, constituíram os dados da pesquisa e tornaram possível esta investigação.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Genética e aos demais professores do departamento, pelo conhecimento transmitido e ajuda durante todas as etapas do Mestrado.

A todos os meus amigos do curso de Pós-Graduação em Genética, por me acolherem, pelo carinho e grande amizade.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Oncogenética Humana, principalmente as meninas (*Márcia, Carolina e Roberta*), pela colaboração, ajuda na parte laboratorial e pela amizade.

A todos os membros do Departamento de Genética, pelo apoio na realização desta dissertação, e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho: muito obrigada!

Em especial...

À minha família, pela confiança e pelo carinho de sempre. E por me receber tão bem sempre que eu voltava a Florianópolis, mesmo que eu tivesse ficado apenas uma semana longe de vocês.

Ao *Marcelo*, pelo enorme apoio durante estes dois últimos anos e durante todo o tempo em que estivemos juntos. Pelo carinho, companheirismo e amor, mesmo à distancia. Amo-te eternamente.

À minha irmã, *Isabela*, pela ajuda no “design” do trabalho e por ser minha S.M.A.

Aos meus pais, *Juarez e Tânia*, por tudo que fizeram por mim, pelo amor que me dedicam sempre e pela confiança. Vocês são tudo na minha vida.

**"Não devemos ter medo dos confrontos.
Até os planetas se chocam,
e do caos nascem as estrelas."**

Charles Chaplin

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 TUMORES DE MAMA	3
1.1.1 HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA.....	7
1.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA AOS TUMORES DE MAMA	10
1.2.1 METABOLIZAÇÃO XENOBIÓTICA.....	12
1.2.2 POLIMORFISMOS DOS GENES DA FASE I.....	14
1.2.2.1 Genes da Superfamília Citocromo P450 (CYPs).....	14
1.2.3 POLIMORFISMOS DOS GENES DA FASE II.....	19
1.2.3.1 Genes da família Glutathiona S-transferases (GSTs).....	19
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	27
4.2 COLETAS DO SANGUE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	28
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA SANGUÍNEO	28
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	28
4.4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i> POR PCR MULTIPLEX.....	29
4.4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>CYP1A1</i> - POLIMORFISMO <i>MspI</i>	31
4.5 ANÁLISE DOS PRODUTOS	34
4.5.1 GENES <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>	34
4.5.2 GENE <i>CYP1A1</i>	34
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5 RESULTADOS	36
5.1 VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS E GENÓTIPOS	36
5.2 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	41
5.3 PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS	41
5.4 COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	63
8 REFERÊNCIAS	65
APÊNDICES	79

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Iniciadores para PCR Multiplex dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> (e <i>CYP1A1</i> : controle interno).....	30
Tabela II	Iniciadores para PCR do gene <i>CYP1A1</i>	32
Tabela III	Variáveis sócio-demográficas das pacientes e respectivos genótipos..	36
Tabela IV	Variáveis sócio-demográficas dos controles e respectivos genótipos..	38
Tabela V	Parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes.....	42
Tabela VI	Parâmetros clínicos dos controles.....	44
Tabela VII	Média e OR dos parâmetros clínicos nas mulheres com genótipo <i>CYP1A1-MspI</i> +/- e -/-.....	47
Tabela VIII	Média e OR dos parâmetros clínicos nas mulheres com genótipo <i>GSTM1</i> -nulo.....	47
Tabela IX	Média e OR dos parâmetros clínicos nas mulheres com genótipo <i>GSTT1</i> -nulo.....	48
Tabela X	Média e OR dos parâmetros clínicos em mulheres com um genótipo considerado de risco.....	48
Tabela XI	Média e OR dos parâmetros clínicos em mulheres com dois genótipos considerados de risco.....	49
Tabela XII	Média dos parâmetros clínicos em pacientes com um e com dois genótipos considerados de risco.....	49
Tabela XIII	Média do tamanho dos tumores nos diferentes genótipos da amostra de pacientes.....	50
Tabela XIV	Grau histológico dos carcinomas nos diferentes genótipos da amostra de pacientes.....	50
Tabela XV	Envolvimento de linfonodos nos diferentes genótipos da amostra de pacientes.....	51
Tabela XVI	Freqüências genotípicas de <i>CYP1A1-MspI</i> em populações caucasóides, segundo dados da literatura.....	52
Tabela XVII	Freqüências genotípicas de <i>GSTM1</i> em populações caucasóides, segundo dados da literatura.....	53
Tabela XVIII	Freqüências genotípicas de <i>GSTT1</i> em populações caucasóides, segundo dados da literatura.....	53

RESUMO

O câncer de mama afeta muitas mulheres no Brasil e a sua incidência vem aumentando a cada ano. Dados para o Estado do Paraná em 2006 estimam 2.970 casos novos, e para Curitiba são estimados 700 casos novos. O principal fator de risco conhecido para o câncer de mama feminino está associado com uma prolongada exposição a altas taxas de estrogênio e devido a isso os polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo do estrogênio podem estar associados com o risco de desenvolvimento do câncer de mama. Os genes da superfamília do Citocromo P450 e os da família das Glutathionas S-transferases têm um importante papel no metabolismo de carcinógenos ambientais e no metabolismo do estrogênio. Este trabalho teve como objetivo investigar a associação entre o câncer de mama e polimorfismos em três genes atuantes na via metabólica do estrogênio (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) num estudo tipo caso-controle com 85 pacientes com câncer de mama e 85 controles pareadas por idade (± 5 anos) e etnia. Examinamos a relação do câncer de mama com deleções nos genes *GSTM1/IT1* e com o polimorfismo *CYP1A1-MspI* numa população caucasóide de Curitiba, PR. Também analisamos os diferentes genótipos considerados de risco em pacientes e controles em função de parâmetros clínicos e em pacientes em função de parâmetros histopatológicos. Foram utilizadas as técnicas de PCR-multiplex e PCR-RFLP, seguidas de eletroforese em gel de agarose para análises moleculares. Nossos resultados não demonstraram associação entre os genótipos estudados: OR = 1,40 (IC 95% = 0,68-2,87) para o polimorfismo *CYP1A1-MspI*; OR = 0,91 (IC 95% = 0,50-1,66) para o polimorfismo do *GSTM1*; e OR = 1,00 (IC 95% = 0,54-1,87) para o polimorfismo do *GSTT1*. Ao combinar os genótipos considerados de risco, também não foi observada associação: OR = 0,56 (IC 95% = 0,26-1,24) para mulheres com um genótipo de risco e OR = 0,99 (IC 95% = 0,41-2,37) para mulheres com dois genótipos de risco. Na análise dos parâmetros clínicos com genótipo *GSTT1*- detectou-se que o tempo médio de uso de pílulas anticoncepcionais foi maior nas pacientes do que nos controles, sendo a diferença estatisticamente significativa. Além disso, a média da idade da menopausa das pacientes com dois genótipos considerados de risco foi significativamente maior do que as pacientes com um genótipo considerado de risco, o que também resultou na diferença significativa do tempo entre a menarca e a menopausa. Em relação aos parâmetros histopatológicos nas pacientes, nenhum resultado significativo foi encontrado. Os valores absolutos dos nossos dados comparados com os da literatura apresentaram-se homoganeamente distribuídos, tanto nas pacientes como nos controles, para o gene *CYP1A1-MspI*. No entanto, para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, as mesmas comparações demonstraram que os dados obtidos não estavam igualmente distribuídos nas diferentes amostras populacionais consideradas, o que reflete provavelmente diferenças metodológicas entre as diferentes publicações.

Palavras-chave: *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, polimorfismos e câncer de mama.

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos com observações relevantes na origem e desenvolvimento do câncer datam de 1890, quando o patologista alemão David Von Hanseemann (citado por MITELMAN, 2000) observou irregularidades nucleares e mitóticas estudando biópsias de carcinomas, seguido de Theodor Boveri (citado por MITELMAN, 2000) que em 1914, postulou que aberrações cromossômicas seriam responsáveis pelo comportamento maligno das células cancerosas. Porém, foi somente na década de 60, que os estudos citogenéticos das células neoplásicas começaram a evoluir e esta teoria pode ser confirmada, constituindo-se como um marco inicial, a descrição do cromossomo Philadelphia (Ph^1) na leucemia mielóide crônica (NOWEL e HUNGERFORD, 1960).

A partir da década de 70, com o surgimento das técnicas de bandeamento dos cromossomos humanos (ZECH, 1969; CASPERSSON et al., 1970 a, b, c, d), os estudos citogenéticos no câncer apresentaram um notável desenvolvimento contribuindo de forma importante para o esclarecimento das aberrações cromossômicas envolvidas e para a formulação de novos conceitos sobre a etiologia genética do câncer. Posteriormente, o desenvolvimento de técnicas de manipulação gênica permitiu a clonagem e a identificação de genes localizados nos pontos de quebra das alterações cromossômicas, possibilitando um grande avanço nos estudos sobre a etiologia da doença, com importantes informações sobre o papel dos oncogenes e genes supressores tumorais.

Os oncogenes são capazes de introduzir ou manter a transformação celular em animais experimentais ou em culturas apropriadamente selecionadas. Representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares normais que controlam uma variedade de processos associados com o crescimento, proliferação e diferenciação celular (BISHOP, 1985; 1987; GORDON, 1985; WEINBERG, 1985). A ativação dos oncogenes celulares pode-se dar por alterações reguladoras, estruturais ou por mutações de ponto. Como consequência dessas alterações, a

expressão dos oncogenes comanda a proliferação anormal das células e a formação do tumor (COOPER, 1994). Outros genes de grande importância para o estudo do câncer são os supressores de tumor. Alterações que inativem estes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991).

Além do envolvimento de oncogenes, genes supressores e outros genes ligados ao ciclo celular, verifica-se que processos ligados à senescência são, por si só, causadores de instabilidade genômica. Sabe-se que a incidência de câncer em seres humanos aumenta exponencialmente com a idade, referendando a sugestão de que múltiplas alterações genéticas são necessárias para a tumorigênese (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993). Portanto, as principais anormalidades genéticas observadas no câncer incluem a expressão aumentada ou ativação mutacional de proto-oncogenes (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), inativação de genes supressores de tumor (WEINBERG, 1991), alterações nos genes de reparo de danos no DNA (HOEIJMAKERS, 2001), instabilidades cromossômicas (LENGAUER et al., 1998), reativação da telomerase (GREIDER e BLACKBURN, 1995) e alterações epigenéticas (ROUNTREE et al., 2001). Assim, um sistema de reparo eficiente é fundamental na manutenção da integridade do genoma, pois evita o acúmulo de lesões no DNA, e a susceptibilidade de uma determinada célula sofrer transformação está diretamente relacionada à sua capacidade em metabolizar carcinógenos (endógenos e exógenos) e em reparar o seu DNA.

O desenvolvimento de câncer dependerá de uma série de fatores, como o tempo e a intensidade da exposição a carcinógenos e a susceptibilidade genética do indivíduo. Polimorfismos gênicos responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos, como as glutatona S-transferases (GSTs), a superfamília do citocromo P450 (CYPs) e N-acetil-transferases (NATs), influenciam diretamente na resposta individual a estes agentes, desde que alelos diferentes condicionam fenótipos com maior ou menor capacidade de metabolização

tanto na biossíntese (genes da fase I), como na degradação (genes da fase II) de carcinógenos.

A maioria dos carcinógenos genotóxicos que contribuem para o desenvolvimento de tumores em seres humanos é considerada inicialmente como pró-carcinógeno, sendo incapaz de reagir com o DNA, pois são compostos estáveis no pH fisiológico. Os carcinógenos são biotransformados por enzimas como Citocromo P450 (fase I) e Glutathione S-transferases (fase II) em compostos hidrossolúveis e, portanto, passíveis de serem excretados. Os produtos gerados são eletrofílicos e poderão reagir com regiões do DNA, levando à formação de adutos, que devem ser reparados antes da divisão celular, caso contrário podem determinar o aparecimento de lesões permanentes no DNA (mutações pontuais, quebra ou rearranjos cromossômicos). Se essas lesões ocorrerem em regiões funcionais de genes que inibam e/ou estimulem a proliferação celular, genes supressores de tumor e proto-oncogenes respectivamente, levando à perda ou ganho da função desses genes, o surgimento de um tumor será favorecido. Estes danos no DNA são irreversíveis e cumulativos, e, após 5 a 7 alterações nesses genes, a célula adquire o fenótipo neoplásico (RIBEIRO et al., 2003).

Os polimorfismos genéticos podem estar associados tanto com a origem como com a progressão maligna. Por causar possíveis efeitos na função da proteína ou em sua expressão, pode-se admitir que os polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos, no metabolismo e/ou síntese de estrogênio, no reparo do DNA e no controle do ciclo celular poderiam predispor indivíduos ao câncer de mama e poderiam também influenciar o fenótipo clínico do tumor (HAN et al., 2004).

1.1 TUMORES DE MAMA

O carcinoma mamário é a malignidade mais comum que afeta mulheres nos países ocidentais, observando-se um aumento de 1 a 2% de casos anuais (PANDIS et al., 1995). Estima-se que, no ano de 2006, ocorram 472.050 novos casos de câncer

no Brasil, sendo que o câncer de mama aparece como o segundo mais incidente entre a população feminina, responsável por 48.930 novos casos (INCA/MS, 2006). O tipo de câncer mais incidente em mulheres, segundo as estimativas, é o câncer de pele não-melanoma, seguido pelo câncer de mama, câncer do colo do útero e câncer de cólon e reto. Estima-se que a cada ano ocorram mundialmente 999.000 novos casos de câncer de mama e 375.000 mortes (PARKIN et al., 2001). Dados para o Estado do Paraná em 2006 estimam 2.970 casos novos de câncer de mama, e para Curitiba são estimados 700 casos novos (INCA/MS, 2006).

O principal sinal do câncer de mama é o nódulo palpável ou tumor no seio, acompanhado ou não de dor mamária. Podem surgir alterações na pele que recobre a mama, como abaulamentos ou retrações ou um aspecto semelhante a casca de uma laranja e podem também surgir nódulos palpáveis na axila (INCA/MS, 2006). As formas mais eficazes para detecção precoce do câncer de mama são o exame clínico da mama e a mamografia.

Devido aos procedimentos diagnósticos, assim como à melhoria da informação nos atestados de óbitos, observou-se um aumento considerável da taxa de mortalidade por câncer de mama entre mulheres, de 1979 a 2000, passando de 5,77/100.000 a 9,74/100.000.

Existe uma variação regional na incidência e mortalidade de câncer de mama no Brasil, onde as áreas mais desenvolvidas apresentam as maiores taxas. Isto sugere que o ambiente e/ou estilo de vida podem estar influenciando na incidência desta doença (INCA/MS, 2006). Mas também, sabe-se que as áreas mais desenvolvidas apresentam melhores procedimentos diagnósticos e melhores informações em atestados de óbitos, o que pode estar influenciando no aumento da taxa de incidência e de mortalidade de câncer de mama nestas regiões.

Apesar de ser considerado como um câncer de prognóstico bom, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada em estágios avançados (estádio III e IV). Investimentos tecnológicos e

em recursos humanos no âmbito de um programa estruturado para detecção precoce desta neoplasia (mamografia), e a implementação de um sistema nacional de informações (auto-exame das mamas) constituem estratégias importantes no sentido de reverter este cenário (INCA/MS, 2006).

As causas do câncer de mama são ainda desconhecidas. Porém, existem alguns fatores de risco relacionados à susceptibilidade. A história familiar se constitui em um fator importante (o risco é duas a três vezes maior), principalmente se o câncer ocorreu na mãe ou em irmã e se desenvolveu antes da menopausa. Outro fator é a exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade. Os diferentes valores de incidência de câncer de mama no mundo são consequência de diferentes exposições ambientais e estilo de vida, comprovados em estudos de migração. Entre os fatores ambientais, a exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) tem sido sugerida para a contribuição no desenvolvimento de câncer de mama (VAURY et al., 1995).

Embora o tabagismo, uma das principais fontes de exposição aos PAHs, não pareça estar associado com o risco de câncer de mama (COLDITZ, 1993), alguns estudos experimentais têm mantido o envolvimento dos PAHs como carcinógenos para câncer mamário (PERERA et al., 1995). TERRY et al. (2002) encontraram associação positiva, porém fraca, em indivíduos que apresentavam longa duração do hábito tabagista. Além disso, outros estudos epidemiológicos vêm sugerindo associações positivas em certos subgrupos de mulheres, por exemplo, mulheres muito jovens que durante a gravidez apresentam o hábito tabagista possuem um risco maior de desenvolver câncer de mama (INNES & BYERS, 2001), assim como mulheres que possuem receptores de hormônios negativos (MANJER et al., 2001).

Outros fatores que, embora controversos, parecem aumentar o risco de câncer de mama são a ingestão de dieta gordurosa e o consumo elevado de álcool (PARKIN et al., 2001). A presença de doença proliferativa benigna da mama apresenta um risco relativo aumentado para o câncer de mama. As hiperplasias atípicas têm um risco maior que as típicas (INCA/MS, 2006).

Os fatores de risco reprodutivos e hormonais aumentam o risco de câncer de mama em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (após os 50 anos de idade, em média), nuliparidade e idade da primeira gestação acima de 30 anos. O risco é elevado devido à exposição a altas taxas de estrogênio endógeno. O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam sendo alvo de muita controvérsia. Aparentemente, certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam pílulas com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo, têm maior risco (PARKIN et al., 2001). Uma recente revisão (COLLINS et al., 2005) sobre o risco de câncer de mama associado com o tratamento de reposição hormonal na menopausa relatou que o risco é maior em mulheres em tratamento do que em mulheres não tratadas ou que interromperam o tratamento. Para essas últimas, o risco diminui logo após o encerramento do tratamento atingindo os parâmetros normais de risco em cinco anos. Além disso, os autores se referem de que o risco de desenvolver câncer de mama é maior em mulheres que utilizam o estrogênio juntamente com a progesterona no tratamento de reposição hormonal, do que em mulheres que utilizam somente estrogênio.

Admite-se que o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama feminino está associado com uma prolongada exposição a níveis aumentados de estrogênio. Os dois principais tipos de estrogênio, 17β -estradiol e estrona (E_2 e E_1 , respectivamente), são ligantes para o receptor de estrogênio e substratos para enzimas oxidativas, como a CYP1A1 (DAWLING et al., 2004). Assim, um dos mecanismos de atuação do estrogênio (principalmente do E_2) na carcinogênese mamária envolve um estímulo proliferativo das células epiteliais, que possibilita uma maior ocorrência de mutações espontâneas (YAGER, 2000). O potencial carcinogênico do estrogênio tem sido relacionado não somente à sua atividade mitótica, mas também ao papel dos estrogênios catecóis como metabólitos carcinógenos (LIEHR, 2000), que podem se ligar ao DNA desencadeando danos no mesmo. Além disso, ao serem metabolizados, os estrogênios catecóis produzem

espécies de oxigênio reativas capazes de causar danos oxidativos ao DNA (LIEHR e ROY, 1990). Há várias enzimas envolvidas no metabolismo do estrogênio, tanto na fase I como na fase II, que são codificadas por sistemas gênicos polimórficos.

Os estudos epidemiológicos, utilizando metodologias moleculares, têm fornecido importantes informações para um melhor conhecimento sobre a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer por meio da análise dos polimorfismos genéticos e das interações genético-ambientais. Os mesmos têm demonstrado uma considerável variabilidade gênica interindividual com potencialidade de definir subpopulações de mulheres com longo tempo de exposição a promotores de crescimento celular, nas quais haveria uma maior probabilidade de ocorrência de eventos mutacionais. No entanto, muitos dos resultados obtidos são controversos e devidos freqüentemente a questões metodológicas como o pequeno tamanho amostral (embora devam ser considerados pelas informações fornecidas para uma análise conjunta), a seleção adequada do grupo controle e biológicas, como, por exemplo, grupo étnico e fatores endógenos. Mesmo considerando as limitações por último citadas, os estudos epidemiológicos moleculares se constituem num poderoso procedimento metodológico para a análise direta de variantes alélicas polimórficas envolvidas no metabolismo do estrogênio. As informações resultantes desses estudos são potencialmente capazes de identificar alvos para a definição de estratégias tanto para a prevenção como para o procedimento terapêutico com repercussões prognósticas (THOMPSON e AMBROSONE, 2000; YAGER, 2000; MITRUNEN e HIRVONEN, 2003).

1.1.1 HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA

O exame histopatológico do câncer de mama fornece informações sobre o diagnóstico da lesão, ajuda na determinação de prognóstico da paciente e leva a uma melhor compreensão da natureza do processo.

Várias classificações histopatológicas estão em uso, sendo que as mais utilizadas são aquelas apresentadas pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP, 1967, citado por DeVITA et al., 1997) e pela Organização Mundial da Saúde (1982, citado por DeVITA et al., 1997).

Segundo estes institutos, os carcinomas mamários são classificados da seguinte forma:

Carcinoma *in situ*: carcinoma ductal *in situ* (DCIS), também denominado carcinoma intraductal ou carcinoma não invasivo, e os carcinomas lobulares *in situ* (LCIS) são caracterizados por uma proliferação de células epiteliais malignas confinadas aos ductos ou lóbulos mamários, sem evidência microscópica de invasão da membrana basal do estroma vizinho.

Carcinoma ductal infiltrante: uma grande variedade de tipos histológicos de carcinomas invasivos (infiltrantes) de mama tem sido descrita. O carcinoma infiltrante designado NOS (“not otherwise specified” = sem outra especificação), em que nenhuma característica histopatológica especial é reconhecida, compreende 70% dos cânceres de mama. Apresenta o pior prognóstico de todos os tipos ductais e cerca de 70% formam metástases nos linfonodos axilares.

Carcinoma medular: apresenta lesões limitadas que podem alcançar grandes dimensões, mas demonstram propriedades infiltrativas de baixo grau. Constituem de 5 a 7% de todos os carcinomas mamários e são caracterizados por uma margem bem delimitada, núcleos pobremente diferenciados, padrão de crescimento sincicial e uma infiltração intensa por pequenos linfócitos e plasmócitos. O prognóstico é melhor do que para o carcinoma ductal NOS.

Carcinoma tubular: um tumor bem diferenciado no qual a formação de túbulo é notável. Este diagnóstico é feito somente se 75% ou mais do tumor é composto destes elementos. Metástases axilares são incomuns, e o prognóstico é consideravelmente melhor do que o do carcinoma ductal NOS.

Carcinoma mucoso: outro tipo ductal, o carcinoma mucoso, mucinoso ou colóide, compreende 3% dos carcinomas mamários. Apresenta baixo crescimento e pode alcançar proporções volumosas. Quando o tumor é predominantemente mucoso, o prognóstico tende a ser favorável.

Carcinoma lobular infiltrante: microscopicamente, caracteriza-se por apresentar pequenas células dispostas num arranjo linear (fila indiana) com tendência a crescer ao redor dos ductos e lóbulos. É relativamente incomum, representando apenas 5 a 10% dos casos de tumores de mama. A apresentação clínica é freqüentemente numa área de espessamento mal definido na mama, diferente da massa dominante do carcinoma ductal. Apresenta, ainda, uma proporção maior de tumores multicêntricos na mesma mama ou na mama oposta do que a encontrada em carcinoma ductal NOS. O carcinoma lobular infiltrante tem uma propensão a envolvimento de linfonodos axilares e o prognóstico é similar ao carcinoma ductal infiltrante. Entretanto, os sítios de metástases tendem a diferir, já que enquanto os carcinomas ductais metastatizam mais caracteristicamente para osso ou para sítios dentro dos parênquimas do pulmão, fígado ou cérebro, os carcinomas lobulares mostram uma predileção para meninges e superfícies serosas.

Doença de Paget: ocorre em 1% de todas as pacientes com câncer de mama. Clinicamente, a paciente apresenta-se com uma história relativamente longa de alterações eczematosas no mamilo. As alterações no mamilo são associadas a um carcinoma subjacente na mama que pode ser palpado em metade a 2/3 das pacientes. Este tumor pode ser do tipo intraductal ou invasivo, sendo o prognóstico relacionado ao tipo histológico do tumor associado.

Carcinoma de mama inflamatório: caracteriza-se clinicamente por edema proeminente na pele, vermelhidão e ardor, uma visível margem erisipelóide e endurecimento do tecido subjacente. Em aproximadamente metade das pacientes a massa não é palpável. Estes critérios, no passado, eram suficientes para o diagnóstico, mas atualmente, pode ser obtida corroboração anátomo-patológica por uma biopsia da pele demonstrando envolvimento dos linfáticos dérmicos com

células cancerosas. Células inflamatórias raramente estão presentes. O prognóstico das pacientes com esta doença é desfavorável, mesmo quando ela está aparentemente localizada.

1.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA AOS TUMORES DE MAMA

A contribuição do ambiente no surgimento do câncer humano e também sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela susceptibilidade genética têm sido evidenciadas graças às pesquisas de epidemiologia molecular (WEINBERG, 1992). Aliando-se a metodologia molecular, principalmente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e a bioquímica, aos dados obtidos pela epidemiologia clássica, possibilita-se, não apenas o levantamento rápido dos riscos populacionais, mas também individuais, no surgimento de neoplasias (FEIGELSON et al., 1996; SHI et al., 1996; KATO et al., 1997). Com isso, consegue-se uma intervenção precoce e é fornecida uma base para o tratamento destas neoplasias (HUSSAIN e HARRIS, 1998).

Estudos de associação do tipo caso-controle têm gerado novas informações sobre o câncer e os mecanismos envolvidos no processo da carcinogênese (BARTSCH, 2000). Para tanto, faz-se necessário o uso de biomarcadores que possam sinalizar eventos em amostras ou sistemas biológicos (NEBERT et al., 1996).

O biomarcador pode ser definido como método, estrutura ou processo que se encontra na via causal, ou intimamente ligado a esta, entre o momento da exposição e o câncer, em qualquer etapa do processo carcinogênico (BARTSCH, 2000). A presença, a quantidade e o padrão de expressão de determinado marcador estão correlacionados com a probabilidade de transformação maligna de uma célula (WOGAN, 1992).

Segundo o Conselho Norte Americano de Pesquisa, são encontradas três

categorias de biomarcadores disponíveis para os estudos em sistemas biológicos (LOURO et al., 2002):

- 1. Marcadores de Susceptibilidade**, que indicam indivíduos ou populações com diferenças biológicas capazes de afetar a resposta do organismo a agentes ambientais (absorção diferencial de micronutrientes e os polimorfismos nos genes de reparo e do biometabolismo).
- 2. Marcadores de Exposição**, que fornecem informações sobre a quantidade de xenobióticos (compostos estranhos aos sistemas vivos) a que os indivíduos estão expostos (detectados na urina, plasma, saliva, etc).
- 3. Marcadores de Efeito**, que indicam a presença da doença ou de sinais pré-clínicos da mesma, representando momentos isolados do processo que podem ser qualitativa ou quantitativamente avaliados (aberrações cromossômicas, *status* hormonais alterados e mutações em oncogenes e genes supressores de tumor).

Um tipo relevante de biomarcador de susceptibilidade está relacionado à presença de polimorfismos dos genes que codificam enzimas cujas modificações podem aumentar ou diminuir a capacidade de substâncias mutagênicas/carcinogênicas interagirem com DNA, RNA ou proteínas (EUBANKS, 1994; GUENGUERICH, 2000). Sabendo-se que muitas destas substâncias não são capazes de provocar por si mesmas os efeitos prejudiciais ao organismo, mas somente quando alteradas por enzimas, qualquer alteração nos genes que as codificam pode ser utilizada como biomarcador. Alguns genes como o *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*, são exemplos de marcadores de susceptibilidade.

1.2.1 METABOLIZAÇÃO XENOBIÓTICA

Muitas enzimas evoluíram para detoxificação de compostos xenobióticos e a expressão gênica das mesmas é induzida em resposta à presença de determinado composto. O sistema de metabolização xenobiótica humano compreende duas classes de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de fase I e as enzimas conjugadas ou de fase II. O objetivo final de ambas as fases da metabolização xenobiótica é aumentar a solubilidade em água dos compostos facilitando assim sua excreção do organismo.

Grande parte dos pró-carcinógenos químicos presentes no meio ambiente estão quimicamente inertes. Para tornarem-se metabólitos altamente reativos capazes de ligarem-se ao DNA e exibirem atividade carcinogênica, necessitam da ativação metabólica pelas enzimas oxidativas (de ativação) da fase I, que são principalmente enzimas da superfamília Citocromo P450. Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno, como o benzo[a]pireno que é convertido em epóxido de benzo[a]pireno (NEBERT, 1991; PERERA, 1996; SHIMADA e FUJII-KURIYAMA, 2004).

Enzimas do Citocromo P450 são as principais enzimas na ativação metabólica dos PAHs, que são alguns dos principais carcinógenos encontrados no meio ambiente como poluentes, em intermediários epóxidos, os quais são convertidos com o auxílio da enzima epóxido-hidrolase a carcinógenos propriamente ditos, os diol-epóxidos (SHIMADA e FUJII-KURIYAMA, 2004).

As reações da fase II envolvem a conjugação (ligação não covalente) de vários xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas (como PAHs) (LOURO et al., 2002), com um substrato endógeno (glutathione, sulfato, glicose, acetato), através das enzimas detoxificadoras glutathione S-transferases, UDP-glucuroniltransferases e N-acetiltransferases que agem então como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis

de excreção, completando o ciclo de detoxificação (NEBERT, 1991; PERSSON et al., 1995), impedindo que a acumulação dessas substâncias no organismo atinja níveis tóxicos e se liguem ao DNA.

As ações das enzimas de fase I e II tornam os compostos mais solúveis e mais rapidamente excretados, devendo diminuir o risco de câncer. Entretanto, os produtos mais solúveis de alguns compostos são ainda mais carcinógenos do que a forma original. Portanto, uma mutação que aumente a expressão gênica ou a atividade da proteína produzida, pode aumentar a quantidade de carcinógenos reativos formados e, então, aumentar o risco de câncer (DUNNING et al., 1999).

Desta forma, os genótipos que conferem variações nos níveis de atividade enzimática das fases I e II estão associados à susceptibilidade individual ao desenvolvimento de câncer (GARTE, 1998; MENDONÇA et al., 2003). Com isso, alguns indivíduos ou subpopulações, como diferentes etnias, podem apresentar risco significativamente maior de desenvolver câncer quimicamente induzido do que a média populacional, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e detoxificação (IDLE, 1991; GILLILAND, 1997; CAPORASO, 1999).

Falhas nesses processos (fase I e fase II) favorecem o acúmulo de alterações ocorridas em regiões de proto-oncogenes e/ou genes supressores de tumor, que estimulam e inibem a proliferação celular, respectivamente, promovendo o surgimento de um tumor (ALBERTS et al., 2002).

Um grande número de genes que codificam enzimas envolvidas nas vias de biotransformação de xenobióticos e na defesa celular foi identificado e clonado, aumentando assim, o conhecimento sobre as variantes alélicas desses genes que tornam a susceptibilidade às doenças variável (THIER et al., 2003).

Muitos genes da superfamília citocromo P450 e glutathione S-transferases, envolvidos na ativação e detoxificação de xenobióticos, são conhecidos pelos seus polimorfismos (MANNERVIK et al., 1985; NEBERT et al., 1996), sendo que algumas destas variantes dos genes *CYPs* e *GSTs* foram encontradas associadas a diversos tipos de câncer.

Esses polimorfismos são freqüentes e, tanto o tipo quanto a freqüência, étnico-dependentes. Os polimorfismos avaliados em populações brasileiras até agora mostram muitas vezes freqüências diferentes das obtidas em etnias semelhantes presentes em outros países, provavelmente reflexo da intensa miscigenação que caracteriza a população brasileira (AMORIM et al., 2002; ROSSINI et al., 2002).

1.2.2 POLIMORFISMOS DOS GENES DA FASE I

1.2.2.1 Genes da Superfamília Citocromo P450 (CYPs)

Esta superfamília compreende pelo menos cinco subfamílias, designadas de A a E pelo sistema de nomenclatura recomendada (NEBERT et al., 1987). Já foram descritos 58 genes no genoma humano, sendo a maioria deles polimórficos e, além disso, existe um grande número de pseudogenes (INGELMAN-SUNDBERG, 2001). Durante a biotransformação, os produtos destes genes atuam nas reações da fase I. Além de participarem do metabolismo de substâncias exógenas como drogas, pesticidas, pró-carcinógenos, entre outros (Goeptar et al., 1995 citado por ORELLANA & GUAJARDO, 2004), as enzimas CYP participam do metabolismo de substâncias endógenas de importância biológica como o colesterol, ácidos biliares, ácidos graxos e hormônios esteróides (CAPDEVILLA et al., 2002). O metabolismo do estrogênio mediado pelo CYP leva à formação de espécies de oxigênio reativas e adutos no DNA, que possuem potencial mutagênico (Shibutani et al., 1991; Terashima et al., 2001; Chakravarti et al., 2001 citados por DAWLING et al., 2004).

Por apresentar uma grande importância na ativação metabólica de pró-carcinógenos, muitos estudos têm objetivado estabelecer uma relação entre a distribuição de variantes polimórficas das diferentes enzimas CYPs e a susceptibilidade ao câncer, tendo sido pesquisados principalmente os genes

CYP1A1, *CYP2D6* e *CYP2E1* (INGELMAN-SUNDBERG et al., 1999).

O gene *CYP1A1* pertence à subfamília *CYP1*, está mapeado no cromossomo 15 (15q22-q24) (HILDEBRAND et al., 1985) e codifica uma enzima que catalisa o primeiro passo no metabolismo de PAHs, gerados pela combustão de fósseis e aminas aromáticas, presentes na fumaça do cigarro e outras fontes ambientais, transformando-os em carcinógenos. Cerca de 10% dos indivíduos caucasóides são portadores de uma forma altamente induzível da enzima (PERERA, 1997). O *CYP1A1* também está envolvido na produção de metabólitos carcinogênicos de estrogênio e na ativação de carcinógenos ambientais (HAN et al., 2004).

Inicialmente foram descritos nove alelos polimorfos, dos quais quatro vêm sendo analisados quanto a uma possível associação à susceptibilidade ao câncer, que são: *CYP1A1**2A, *2B, *3 e *4. Novas variantes vêm sendo descritas a cada ano (SMART e DALY, 2000; CHEVALIER et al., 2001; SAITO et al., 2003) e, num estudo recente envolvendo a população do Rio de Janeiro uma nova variante foi descrita (AMORIM et al., 2004), atingindo um total de 16 alelos descritos.

Com o conhecimento da existência de diversas variantes já descritas do gene *CYP1A1* ressalta-se a necessidade de verificação dos vários haplótipos decorrentes das várias combinações e do possível impacto de cada um deles como moduladores na susceptibilidade ao câncer (GARTE et al., 1996).

A frequência populacional dos vários alelos varia conforme o grupo étnico estudado, fazendo com que determinados genótipos sejam mais comuns em determinadas populações, facilitando a detecção de associação ao câncer ou a outras doenças mesmo em amostras caso-controle menores, enquanto que para frequências alélicas mais baixas a amostra teria que ser muito maior para que ocorra a detecção de associação estatisticamente significativa dos alelos com alguma doença. Uma outra explicação para variação na susceptibilidade entre diferentes etnias seria a presença de diferenças na ligação genética entre os alelos nesses grupos (GARTE, 1998).

Utilizando a enzima de restrição *MspI*, foi detectado um alelo denominado

*CYP1A1**2A, que apresenta uma citosina no lugar de uma timina na região 3' flanqueadora do gene *CYP1A1* (6235T para C), dando origem a um sítio de restrição *MspI* (KAWAJIRI et al., 1990). Este polimorfismo parece promover o aumento da expressão gênica (ARVANITIS et al., 2001). Ao estudar este polimorfismo, três genótipos podem ser observados: *m1/m1*, que é o homozigoto selvagem e conseqüentemente não possui o sítio de restrição *MspI*, *m2/m2*, que é o homozigoto mutante e então seus dois alelos apresentam o sítio de restrição *MspI* e *m1/m2* formando o genótipo heterozigoto (CROFTS et al., 1993).

Este polimorfismo tem sido fortemente associado com o risco de câncer de mama em mulheres afro-americanas (TAIOLI et al., 1995), mas não em mulheres caucasóides (TAIOLI et al., 1999). Estes autores sugeriram que este polimorfismo pode ser um marcador do metabolismo alterado do estradiol, levando ao aumento na susceptibilidade do risco de desenvolver câncer de mama relacionado ao estrogênio.

Em japoneses e em certas populações caucasóides, o risco aumentado de câncer de pulmão está correlacionado positivamente com um ou ambos os polimorfismos do gene *CYP1* (*MspI* e isoleucina – valina, este último devido a uma mutação no exon 7) (NAKACHI et al., 1991; KAWAJIRI et al., 1996; XU et al., 1996) e diretamente associado ao hábito tabagista.

Em uma meta-análise realizada por GARTE et al. (2001), as freqüências descritas para o polimorfismo *MspI* em 4453 indivíduos caucasóides foram de 82,4% indivíduos *m1/m1*, 16,4% indivíduos *m1/m2* e 1,2% indivíduos *m2/m2*. Entre indivíduos africanos (n = 461) as freqüências foram de 58,1% *m1/m1*, 36% *m1/m2* e 5,9% *m2/m2*, e entre asiáticos (n = 638) as freqüências obtidas foram de 42% *m1/m1*, 44% *m1/m2* e 14% *m2/m2*.

LI et al. (2004) procurando estabelecer uma associação entre os polimorfismos do *CYP1A1*, o hábito tabagista e o câncer de mama, descreveram freqüências do polimorfismo *MspI* de 78% *m1/m1*, 20% *m1/m2* e 2% *m2/m2* entre mulheres caucasóides americanas do grupo controle (n = 417) e de 59% *m1/m1*, 36% *m1/m2* e 5% *m2/m2* entre mulheres afro-americanas do grupo controle (n =

285).

Em um estudo, com tamanho amostral pequeno, realizado na população brasileira caucasóide (Rio de Janeiro), a amostra controle (n = 25) apresentou frequências de 72% *m1/m1*, 28% *m1/m2* e 0% *m2/m2* (NAKATA et al., 2004).

Com o avanço das pesquisas, cada vez mais o gene *CYP1A1* (exclusivamente ou combinado a outros genes) vem sendo relacionado a diversos tipos de câncer, em diferentes etnias, pois muitos estudos sugerem que alguns alelos polimorfos do gene *CYP1A1* podem estar relacionados à susceptibilidade ao câncer e outras doenças ao alterarem as isoenzimas (KAWAJIRI, 1999). Como em alguns exemplos, há sugestões de associações entre alelos polimorfos e o desenvolvimento de câncer, necessita-se de estudos mais aprofundados, tais como: câncer da cavidade bucal (NAIR e BARTSCH, 2001), câncer de pulmão (ANTTILA et al., 2003; DIALYNA et al., 2003; CHIOCCA e WAXMAN, 2004), câncer de mama (AKTAS et al., 2002; YE e SHAN, 2002; MITRUNEN e HIRVONEN, 2003; MIYOSHI e NOGUCHI, 2003), câncer de próstata (ACEVEDO et al., 2003), carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (MENDONÇA et al., 2003), câncer de ovário (AKTAS et al., 2002), entre outros. BAILEY et al. (1998) não encontraram nenhuma associação entre polimorfismos do *CYP1A1* e o desenvolvimento de câncer de mama.

Polimorfismos nos genes envolvidos na biossíntese do estrogênio (*CYP17*, *CYP19*) e na sua metabolização (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *COMT*) podem modular a susceptibilidade ao câncer de mama (MIYOSHI et al., 2003; OKOBIA et al., 2005). O estrógeno participa de eventos carcinogênicos e pode estar relacionado também na indução de câncer de ovário, já que sua metabolização (do estrógeno) gera compostos eletrofílicos. Sabe-se que esses compostos podem estabelecer ligações covalentes com o DNA, induzindo mutações oncogênicas e estimulando a proliferação celular (AKTAS et al., 2002).

Outros genes polimórficos da família *CYP*, como *CYP2E1* e *CYP2D6*, também já foram associados à maior susceptibilidade ao câncer. O gene *CYP2E1*

está mapeado em 10q24.3 (KOLBLE, 1993) e codifica uma enzima que catalisa a oxidação de muitos pró-carcinógenos, como benzeno, estireno e nitrosaminas. O alelo mutante (c2) resulta de uma substituição G/C no alelo selvagem (c1). A frequência do alelo mutante é relativamente baixa em diferentes populações, por exemplo, 5% em caucasóides (PERSSON et al., 1993) e tem sido associada a uma menor expressão do gene *in vivo*, o que resultaria em susceptibilidade ao câncer de pulmão (PERSSON et al., 1993; EL-ZEIN et al., 1997); cavidade bucal (HUNG et al., 1997) e esôfago (LIN et al., 1998). O gene *CYP2D6* está mapeado em 22q13.1 (GOUGH et al., 1993) e codifica uma enzima envolvida no metabolismo de pelo menos 80 drogas, como antidepressivos, antiarrítmicos, neurolépticos, entre outros (AUTRUP, 2000). A maioria dos indivíduos (80-90%) possui pelo menos um alelo selvagem (*CYP2D6*1*) e são classificados funcionalmente como bons metabolizadores. Outros indivíduos são metabolizadores pobres e ultra-rápidos, respectivamente, devido a uma mutação e à amplificação do alelo selvagem. Há uma grande variabilidade étnica dos possíveis genótipos e, conseqüentemente, dos possíveis fenótipos em relação à atividade da enzima (SACHSE et al., 1997). Foi observada associação entre este gene e o carcinoma de pulmão (CAPORASO et al., 1989; 1990) e câncer bucal (WORRALL et al., 1998). Indivíduos com fenótipo de bons metabolizadores foram relacionados com câncer de bexiga (ANWAR et al., 1996), provavelmente pela intensa metabolização de agentes da dieta que formam intermediários reativos em vários tecidos (HATAGIMA, 2002). Por outro lado, os indivíduos com baixa metabolização parecem apresentar um risco elevado de desenvolvimento de leucemias (RODDAM et al., 2000) e câncer bucal (WORRAL et al., 1998).

1.2.3 POLIMORFISMOS DOS GENES DA FASE II

1.2.3.1 Genes da família Glutathione S-transferases (GSTs)

As enzimas glutathione S-transferases (GSTs) possuem a função básica de detoxificação, mediando a conjugação de um grande número de compostos eletrofílicos com glutathione reduzida (GSH), numa reação metabólica de fase II (PICKETT e LU, 1989). Estas enzimas possuem a capacidade de detoxificar os metabólitos reativos dos PAHs, prevenindo que eles reajam com o DNA (AMORIM et al., 2002), e também atuam na proteção contra produtos do estresse oxidativo (Hayes, 1995 citado por EGAN et al., 2004).

Além disso, as GSTs têm um importante papel no metabolismo do estrogênio (CAVALIERI et al., 1997). Elas agem na metabolização de esteróides e radicais livres que podem indiretamente ser produzidos pelo metabolismo do estrogênio, reduzindo sua genotoxicidade. Assim, polimorfismos nos genes GSTs podem modificar o risco de desenvolver câncer de mama relacionado ao estrogênio (PARK et al., 2003).

Sete classes distintas foram identificadas: *alpha* (α); *mu* (μ); *pi* (ρ); *sigma* (σ); *theta* (θ); *kappa* (κ) e *zeta* (ζ) (LANDI, 2000), sendo que a expressão das classes *mu* e *pi* predominam em células mamárias (EGAN et al., 2004). Cada classe é codificada por um único gene ou por uma família gênica. Os genes H(a) ou A codificam a classe protéica *alpha*, e os genes H(b) ou B codificam a classe *mu*. De JONG et al. (1991) concluíram que os genes B estão localizados em três cromossomos diferentes: 1, 6 e 13 e sugeriram a existência de polimorfismos do tipo presença/ausência de um ou mais genes.

Na classe *mu*, cinco genes (*GSTM1* a 5) foram mapeados no cromossomo 1 (1p13.3). Os genes estão separados por aproximadamente 20 kb e localizados na seguinte ordem: 5'...*GSTM4* – *GSTM2* – *GSTM1* – *GSTM5*...3'. O gene *GSTM3* localiza-se após o *GSTM5*, porém numa orientação 3'- 5'. Três alelos diferentes foram identificados no mesmo loco, incluindo a deleção do gene (*GSTM*0*) e duas

outras mutações (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) que diferem na substituição da base C por G na posição 534 (REBBECK, 1997).

Indivíduos com pelo menos um dos dois alelos funcionais para *GSTM1* (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) são chamados *GSTM1*-positivos e apresentam a mesma eficiência metabólica. Já os indivíduos portadores da deleção deste gene são designados *GSTM1*-nulos (GATTÁS et al., 2004), pois a deleção freqüentemente está presente em ambos alelos resultando no genótipo homocigoto nulo (ROODI et al., 2004). O alelo nulo *GSTM1* resulta de uma recombinação homóloga envolvendo repetições de 4,2Kb em 5' e 3' (XU et al., 1998), que causa uma deleção de 16Kb contendo todo o gene *GSTM1*. A excisão desse gene é precisa, deixando os genes adjacentes intactos.

Indivíduos *GSTM1*-nulos exibem ausência da atividade enzimática e sugere-se que eles possuam um risco aumentado para efeitos de uma grande variedade de carcinógenos ambientais (MILLIKAN et al., 2000). O genótipo *GSTM1*-nulo foi positivamente associado com níveis altos de adutos no DNA, sugerindo que este possa influenciar na carcinogênese (Nazar-Stewart et al., 1993 citado por LIZARD-NACOL et al., 1999).

O genótipo nulo tem uma freqüência acima de 50% entre caucasóides, chineses e indianos (BOARD et al., 1990). Em alguns estudos realizados em populações brasileiras as freqüências do genótipo nulo descritas foram de 55% (ARRUDA et al., 1998), 60,2% (GATTÁS e SOARES-VIEIRA, 2000), 48,9% (ROSSINI et al., 2002) e 55,4% (GATTÁS et al., 2004). Devido à alta freqüência do genótipo nulo na maioria das populações analisadas, que varia entre os grupos étnicos, a distribuição alélica deste gene tem sido muito estudada.

Segundo a revisão bibliográfica de DUNNING et al. (1999), entre cinco estudos realizados para conferir a associação entre o *GSTM1*-nulo e o risco de desenvolvimento de câncer de mama, apenas um deles mostrou que os indivíduos nulos possuíam risco maior de desenvolver este tipo de câncer, sendo que neste estudo, realizado por HELZLSOUER et al. (1998), o efeito foi restrito para câncer

de mama pós-menopausa. Outro resultado significativo indica um risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres acima de 50 anos de idade (CHARRIER et al., 1999).

Na meta-análise realizada por EGAN et al. (2004), vários estudos reportaram aproximadamente 20-50% de risco elevado de câncer de mama em mulheres *GSTM1*-nulas. PARK et al. (2000) encontraram uma forte associação (OR = 2,0; CI 95% = 1,0-3,7) entre este genótipo e o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres pré-menopausa.

Entretanto, deve-se ressaltar que a maioria dos estudos realizados indica uma falta de associação do *GSTM1*-nulo e o câncer de mama (BAILEY et al., 1998; DUNNING et al., 1999; MILLIKAN et al., 2000). O estudo de ROODI et al. (2004) sugere um efeito protetor ao câncer de mama em mulheres *GSTM1*-nulas, sugerindo que a alta frequência deste genótipo ocorre por oferecer uma vantagem para a sobrevivência da célula.

Foi demonstrada a associação do genótipo *GSTM1*-nulo com níveis altos de transcrição do gene *CYP1A1* (VAURY et al., 1995) e também foi sugerida a sua associação com um início mais precoce de desenvolvimento de câncer de mama (FONTANA et al., 1998). De acordo com GEISLER e OLSHAN (2001), indivíduos deficientes em múltiplos passos enzimáticos possuem um maior risco de desenvolver câncer. Eles sugerem que haveria uma maior susceptibilidade em indivíduos com alterações na fase I da metabolização, como as conferidas por alterações no *CYP1A1*, concomitantes com a deleção do gene *GSTM1*.

SEIDEGARD et al. (1986, 1990) encontraram uma associação entre o genótipo *GSTM1*-nulo e susceptibilidade ao câncer de pulmão. ZHONG et al. (1993) descreveram um excesso de indivíduos com este genótipo entre casos de câncer coloretal: 56,1% comparado com 41,8% do grupo controle. Mais de 70% dos indivíduos com tumores no colon proximal são portadores do genótipo nulo.

Outro gene de importância nos estudos sobre susceptibilidade ao câncer, é o da classe *theta GSTT1*, mapeado no cromossomo 22 (22q11.2) (PEMBLE et al.,

1994). A enzima codificada por este gene é capaz de detoxificar pequenos hidrocarbonetos reativos, como o diepoxibutano (PEMBLE et al., 1994).

O gene *GSTT1* também é polimórfico e apresenta um alelo nulo (*GSTT1*0*) que resulta na ausência da produção da enzima em indivíduos homocigotos (PEMBLE et al., 1994). Em humanos, a conjugação do halometano dependente de glutathione é polimórfica, com 60% da população classificada como “conjugadores” e 40% como “não conjugadores”. PEMBLE et al. (1994) demonstraram que o gene *GSTT1* está ausente em 38% da população. A presença ou ausência do gene é coincidente com o fenótipo conjugador (*GSTT1+*) e não conjugador (*GSTT1-*). A ausência da enzima implica na não detoxificação de uma série de compostos, como os halometanos sintéticos e outros químicos industriais.

As freqüências do *GSTT1*-nulo descritas na literatura são menores do que as descritas para o *GSTM1*-nulo e há uma baixa variação entre diferentes grupos étnicos. Há indicações de que a única exceção ocorra em asiáticos, que apresentam uma freqüência maior de genótipo *GSTT1*-nulo, variando de 46 a 58% em chineses e de 42 a 46% em coreanos (GEISLER e OLSHAN, 2001). Em um estudo na população brasileira, as freqüências descritas foram de 26,3% em negros, 22,3% em brancos e 17,2% em mulatos (GATTÁS et al., 2004). Outros estudos realizados na população brasileira, mas somente em caucasóides apontam freqüências de 18,5% (ARRUDA et al., 1998) e 25,1% (ROSSINI et al., 2002).

A maioria dos estudos realizados com o *GSTT1* que buscam associação com o câncer de mama não tem encontrado esta associação, ou tem apresentado resultados conflitantes (BAILEY et al., 1998; HELZLSOUER et al., 1998; GARCIA-CLOSAS et al., 1999; MITRUNEN, 2001; MATHESON et al., 2002). O estudo de GARCIA-CLOSAS et al. (1999) sugere um risco baixo de desenvolvimento de câncer de mama para mulheres que são *GSTT1*-nulas.

CHEN et al. (1996) descreveram um método para a caracterização simultânea dos alelos *GSTM1* e *GSTT1* e estudaram os genótipos em afro-descendentes e caucasóides. A freqüência do genótipo nulo para o *GSTM1* foi maior em brancos e

para *GSTT1*-nulo maior em afro-descendentes. A frequência observada do genótipo “duplo nulo” não foi significativamente diferente do previsto, assumindo que os dois polimorfismos são independentes. Genótipos *GSTT1* e/ou *GSTM1* nulos estão associados a um aumento de risco de câncer de bexiga, pulmão, coloretal e de cabeça e pescoço (COTTON et al., 2000; ENGEL et al., 2002); assim, como a outros tipos de câncer, pois a ausência dessas enzimas poderia reduzir a capacidade de um organismo detoxificar metabólitos reativos. Além disso, os níveis de aductos de DNA, trocas entre cromátides-irmãs e mutações genéticas somáticas podem ser maiores em portadores dos genótipos *GSTM1/GSTT1* nulos (REBBECK, 1997).

Os genótipos *GSTM1/GSTT1* nulos foram positivamente associados com o câncer de mama em mulheres com história familiar de câncer de mama (MILLIKAN et al., 2000).

A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em taxas que variam de 20 a 70% nas diferentes populações investigadas, enquanto para o *GSTT1*, essa taxa é descrita como sendo de 11 a 38% (ABDEL-RAHMAN et al., 1996).

Outro polimorfismo dos genes GSTs a ser considerado, refere-se ao da classe *pi*, *GSTP1*. Este gene está localizado no cromossomo 11 (11q13) (MOSCOW et al., 1988; BOARD et al., 1989) e a enzima é expressa principalmente no pulmão, baço, coração e placenta (KELLEY et al., 1994).

Quatro alelos polimórficos foram descritos: o alelo selvagem *GSTP1A* e três variantes denominadas *GSTP1B*, *C* e *D*, resultantes de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos códons 105 e 114. Os alelos *A* e *D* codificam enzimas com o aminoácido Ile na posição 105, sendo que na posição 114 irão possuir respectivamente Ala e Val. Já os alelos *B* e *C*, codificam Val na posição 105 e respectivamente Ala e Val na posição 114. O alelo selvagem é o mais frequente e a variante *D* a mais rara (WATSON et al., 1998).

Vários estudos têm demonstrado que as isoformas apresentam diferenças na especificidade de ligação ao substrato e na estabilidade térmica, conferindo diferentes atividades catalíticas (ALI-OSMAN et al., 1997; HARRIES et al., 1997).

Enzimas que contém Val na posição 105 (codificadas pelos alelos *B* e *C*) possuem uma atividade catalítica aumentada em sete vezes para hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, porém três vezes menor para 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno quando comparadas com as enzimas codificadas pelo alelo *A* (ALI-OSMAN et al., 1997; HARRIES et al., 1997; SUNDBERG et al., 1998; WATSON et al., 1998).

A expressão aumentada do gene *GSTP1* tem sido associada com a transformação maligna, resistência às drogas antitumorais e diminuição da sobrevivência (COMMANDEUR et al., 1995). Em muitos tumores a expressão está aumentada em relação ao tecido normal do mesmo indivíduo. Sugere-se que portadores dos alelos *B* e *C* têm maior probabilidade de desenvolvimento de câncer de pulmão (RYBERG et al., 1997) e que portadores do alelo *C* apresentam uma frequência quatro vezes maior entre os pacientes com glioma (ALI-OSMAN et al., 1997).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é um dos principais problemas mundiais em saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o número de casos deve aumentar de 10 milhões no ano de 2000, para 15 milhões em 2020, sendo que 60% dos casos novos devem ocorrer nos países em desenvolvimento (OMS, 2004). Ocorrem 7 milhões de mortes a cada ano devido ao câncer, o que representa 12,5% de todas as mortes no mundo (OMS, 2005).

De acordo com a OMS, os estudos populacionais são de grande importância para a identificação de fatores etiológicos e populações susceptíveis ao desenvolvimento tumoral, subsidiando o estabelecimento de estratégias de prevenção mais eficientes.

No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres, e as estatísticas apontam o aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (INCA/MS, 2006).

Os estudos epidemiológicos, utilizando metodologias moleculares, têm fornecido importantes informações para um melhor conhecimento sobre a susceptibilidade para o desenvolvimento de câncer por meio da análise dos polimorfismos genéticos e das interações genético-ambientais. Os mesmos têm demonstrado também uma considerável variabilidade gênica interindividual com potencialidade de definir subpopulações de mulheres com longo tempo de exposição a promotores de crescimento celular nas quais haveria uma maior probabilidade de ocorrência de eventos mutacionais.

Considerando que sistemas gênicos polimórficos como *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1A1* são responsáveis pelas reações de metabolismo xenobiótico, podendo influenciar significativamente na susceptibilidade aos carcinógenos e conseqüentemente ao desenvolvimento de câncer, torna-se imprescindível a realização de estudos populacionais destes biomarcadores de susceptibilidade.

3 OBJETIVOS

A biotransformação tem uma importante atuação na atividade carcinogênica. É descrita uma grande variação individual na resposta a esse fenômeno e os polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo podem, em parte, serem responsáveis por estas diferenças.

Como objetivo principal, pretende-se identificar marcadores moleculares que auxiliem na prevenção e no diagnóstico, prognóstico e terapêutica de portadores de tumores mamários. Para isso, tem-se como objetivos específicos:

- Avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes do biometabolismo *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1A1* (polimorfismo *MspI*).
- Realizar um estudo tipo caso-controle, procurando verificar a associação com a carcinogênese mamária.
- Analisar os diferentes genótipos estudados em pacientes e controles em função de parâmetros clínicos.
- Analisar os diferentes genótipos das pacientes em função de parâmetros histopatológicos.
- Comparar as frequências gênicas e genótípicas observadas com outras descritas na literatura, objetivando contribuir para um melhor conhecimento da dinâmica populacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo foi realizado com amostras de sangue periférico de 85 pacientes femininas portadoras de carcinomas mamários do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba, Paraná, e de 85 mulheres sem evidências de carcinomas mamários (grupo controle), pareadas pelo grupo racial e faixa etária (± 5 anos).

A média da idade das pacientes foi $58,60 \pm 13,67$ anos e a média da idade dos controles foi $56,05 \pm 13,59$ anos, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($t = 1,22$; $P > 0,20$).

Os indivíduos do grupo controle foram selecionados entre os doadores voluntários de medula óssea do Laboratório de Imunogenética Humana da Universidade Federal do Paraná, entre os indivíduos pertencentes ao banco de DNA controle do Laboratório de Mutagênese da Universidade Estadual de Londrina e entre os moradores do Asilo Maria Teresa, de São José dos Pinhais, Paraná.

Foi realizado um contato pessoal com cada doador que recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa (Apêndice I) e o formulário para assinatura do Consentimento Informado (Apêndice II), para posterior coleta do material. As mulheres participantes também forneceram as informações apresentadas no questionário em anexo (Apêndice III).

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba-PR. Processo número 25000.007020/2003-93; registro no CONEP:7220 e parecer número 251/2003, de 20 de fevereiro de 2003.

4.2 COLETAS DO SANGUE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. De cada indivíduo foram coletados cerca de 10 ml de sangue periférico, o qual foi imediatamente colocado em tubos estéreis contendo 1,75 ml de solução anti-coagulante-ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e enviados para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR e mantidos a 4°C até o momento do processamento.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA SANGUÍNEO

O procedimento utilizado para a extração do DNA sanguíneo foi o método de *salting out*, descrito por MILLER et al. (1988), que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular. Esta técnica consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol.

Após a extração, foi realizada a leitura da densidade óptica do DNA e foram feitas soluções de uso na concentração de 20 ng/μl.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para a detecção de alelos dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para cada um dos locos estudados, já estando padronizadas as respectivas condições de amplificação e análise dos produtos.

4.4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* POR PCR MULTIPLEX

A reação de co-amplificação em cadeia foi realizada baseada no protocolo para PCR Multiplex de ABDEL-RAHMAN et al. (1996) nas seguintes condições:

- 2,5 µl de tampão da enzima (20 mM de tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl);
- 1,0 µl de MgCl₂ (2 mM);
- 1,0 µl de cada iniciador (100 ng/µl): *GSTM1*₁, *GSTM1*₂, *GSTT1*₁, *GSTT1*₂, *CYP1A1*₁, *CYP1A1*₂ (Tabela I);
- 0,25 µl de Taq DNA polimerase (5 U);
- 5,0 µl de dNTPs (2 mM) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- 5,25 µl de água ultra-pura estéril.

Todos os reagentes citados acima foram misturados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação.

Em cada microtubo de 0,5 ml foi pipetado 5 µl do DNA genômico (20 ng/µl) previamente extraído e 20 µl da mistura de reação, somando um volume total de 25 µl. Em cada análise foi usado como controle negativo um microtubo contendo água no lugar do DNA genômico.

Os microtubos foram levados ao termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) e submetidos ao programa:

- 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- 30 ciclos: 94°C por 2 minutos, 59°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto;
- 1 ciclo: 72°C por 4 minutos;

Após o término da reação de PCR, o produto da PCR foi guardado em geladeira (4°C) até sua utilização.

Tabela I- Iniciadores para PCR Multiplex dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (e *CYP1A1*: controle interno)

GENES	INICIADORES
	<i>GSTM1</i>:
	5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' e 5'GTTGGGCTAAATATACGGTGG3'
	<i>CYP1A1</i>:
<i>GSTM1 e GSTT1</i>	5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'
	<i>GSTT1</i>:
	5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3' e 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'

O padrão de bandas visualizado após a PCR Multiplex está representado na Figura 1. Os iniciadores para o gene *CYP1A1* amplificam um fragmento constante de 312 pb, o qual é usado como controle interno da reação, excluindo a possibilidade de uma falsa interpretação dos resultados devido à ausência da reação de amplificação. O fragmento de 215 pb é visualizado somente nos casos de indivíduos que possuam o genótipo *GSTM1* positivo, e o fragmento de 480 pb apenas nos casos de indivíduos que possuam o genótipo *GSTT1* positivo. A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indica os respectivos genótipos nulos para cada gene.

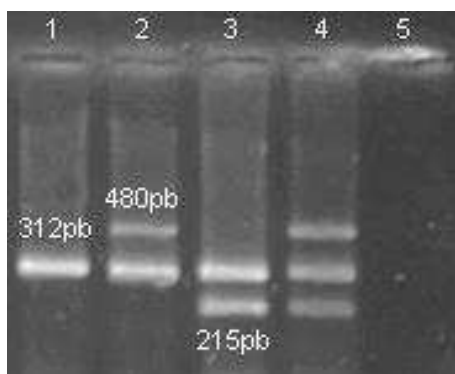


Figura I – Padrão de bandas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (*CYP1A1*: controle interno).

Coluna 1: genótipos *GSTM1*- e *GSTT1*-; coluna 2: genótipos *GSTT1*+ e *GSTM1*-; coluna 3: genótipos *GSTT1*- e *GSTM1*+; coluna 4: genótipos *GSTT1*+ e *GSTM1*+; coluna 5: controle negativo (água + reagentes).

4.4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *CYP1A1*- polimorfismo *MspI*

Este polimorfismo é atribuído à presença (CCGG) ou ausência (CTGG) do sítio *MspI* no exon 7 (posição 6235 da molécula de DNA) na região flanqueadora 3', e representa uma transição de timina para citosina (GOTO et al., 1996; FONTANA et al., 1998). Para detecção dos diferentes alelos foi utilizada a técnica de PCR-RFLP.

Na primeira etapa foi realizada a PCR baseada no protocolo de CARSTENSEN et al. (1993), modificado:

- 0,3 µl dos iniciadores C44 e C47 (20 pMol) (Tabela II);
- 0,3 µl de dNTPs (25 mM);
- 0,5 µl de Taq DNA polimerase (5 U);
- 5,0 µl de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCL, pH 8,0; 500 mM de HCL (10X concentrado);
- 2,0 µl de MgCl₂ (50 mM);
- 36,6 µl de água ultra-pura estéril.

Todos os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação.

Em cada microtubo de 0,5 ml foi pipetado 5 µl do DNA genômico (20 ng/µl) previamente extraído e 45 µl da mistura de reação, somando um volume total de 50 µl. Em cada análise foi usado como controle negativo um microtubo contendo água no lugar do DNA genômico.

Os microtubos foram levados ao termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) e submetidos ao programa:

- 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- 30 ciclos: 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1,5 minutos;
- 1 ciclo: 72°C por 2 minutos;

Após o término da reação de PCR, o produto da PCR foi guardado em geladeira (4°C) até sua utilização.

Tabela II - Iniciadores para PCR do gene *CYP1A1*

GENE	INICIADORES
<i>CYP1A1</i> (<i>MspI</i>)	C44-5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3' C47-5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3'

Após a PCR realizou-se a segunda etapa através da clivagem com a enzima *MspI*, de acordo com o protocolo seguinte:

- 1,5 U de enzima de restrição *MspI*;
- 1,4 µl de tampão da enzima: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl₂, 10X concentrado.
- 2,45 µl de água ultra-pura estéril.

Os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação. Em cada microtubo de 0,5 ml foi pipetado 10 µl do produto da PCR e 4 µl da mistura de reação, somando um volume total de 14 µl. A reação permaneceu a 37°C durante cerca de 3 horas.

Os iniciadores C44 e C47 originam um produto de amplificação de 340 pb referente ao genótipo homozigoto selvagem (+/+), o qual não sofre ação da enzima de restrição *MspI*, originando uma banda não clivada. O genótipo homozigoto mutante (-/-) possui um sítio para a enzima de restrição *MspI*, que cliva o produto de amplificação, gerando duas bandas de 200 pb e 140 pb e o genótipo heterozigoto (+/-) corresponde às 3 bandas de 340, 200 e 140 pb (CARSTENSEN et al., 1993), como mostra a figura abaixo:

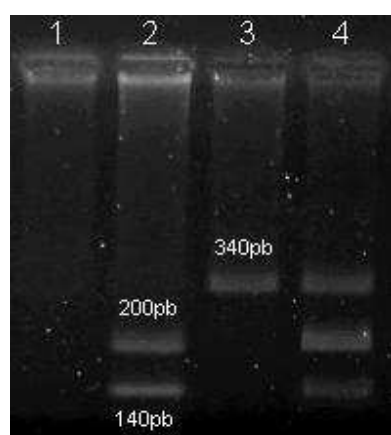


Figura II - Padrão de bandas do gene *CYP1A1*- *MspI*

Coluna 1: controle negativo (água + reagentes); coluna 2: genótipo homozigoto mutante (-/-); coluna 3: genótipo homozigoto selvagem (+/+); coluna 4: genótipo heterozigoto (+/-).

4.5 ANÁLISE DOS PRODUTOS

4.5.1 GENES *GSTM1* e *GSTT1*

Ao microtubo contendo o produto da PCR foi misturado 5µl de corante azul de bromofenol (15ml de ficol, 20ml de H₂O e 0,0125g de azul de bromofenol), para visualização da corrida. Foi aplicada no gel uma alíquota de 15µl de cada reação e foi utilizado um marcador de peso molecular com fragmentos que diferem em 50 pb, o qual foi colocado na primeira canaleta do gel.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,8% (Tampão TBE 1X; agarose), durante 50 minutos a 100 volts. A cuba para eletroforese continha tampão TBE 1X (Solução 10X: 121,1g de Tris, 61,83g de Ácido Bórico, 40ml de EDTA 0,5M e água ultra-pura para completar volume de 1000ml). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (10mg/ml) por cerca de 10 minutos. O gel foi então observado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado (Figura I).

4.5.2 GENE *CYP1A1*

Para verificação da amplificação da PCR foi retirada uma alíquota de 10µl de produto de PCR e misturada com 5µl de corante azul de bromofenol. Foi então realizada eletroforese em gel de agarose a 1,8%, seguindo as mesmas condições utilizadas para os genes *GSTM1* e *GSTT1*. Uma vez confirmada esta amplificação, foi realizada a reação de clivagem.

Ao microtubo contendo a reação de clivagem foi adicionado 2 µl de corante azul de bromofenol e foi aplicado no gel cerca de 16 µl desta mistura. Também foi aplicado no gel um marcador de peso molecular com fragmentos que diferem em 50 pb, a fim de identificar o peso molecular de cada amostra.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 3% (Tampão TBE 1X; agarose), durante 1 hora e 20 minutos a 80 volts. A cuba para eletroforese continha tampão TBE 1X. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (a concentração de 10mg/ml) por cerca de 10 minutos. O gel foi então observado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado (Figura II).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genótípicas observadas foram comparadas com as esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg.

Para analisar a associação entre as variantes polimórficas estudadas e o câncer de mama, foram comparadas as frequências dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* de indivíduos portadores de câncer de mama com as de indivíduos controles, através das tabelas de contingência 2X2. Os valores de Odds Ratio (OR) são determinados pelo teste exato de Fisher com o auxílio do programa RXC (MILLER, 1997). O valor de $P \leq 0,05$ foi adotado como limite de significância.

O teste do qui-quadrado foi aplicado com o objetivo de verificar se os genótipos observados se distribuíam igualmente em pacientes e controles e em diferentes amostras da literatura, incluindo os dados obtidos neste trabalho.

Para a análise de diferentes parâmetros clínicos, como a idade da menarca, idade da menopausa, tempo de uso de pílula anticoncepcional e tempo decorrido entre a menarca e a menopausa, com os genótipos considerados de risco foram realizados testes de *Student (t)* entre as médias obtidas para cada parâmetro nas pacientes e nos controles. O teste *t* de *Student* também foi aplicado para analisar a significância das diferenças entre as médias dos tamanhos dos tumores das pacientes.

A análise do grau histológico dos carcinomas e do envolvimento de linfonodos regionais (presença ou ausência) foi realizada através do teste de qui-quadrado.

5 RESULTADOS

5.1 VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS E GENÓTIPOS

As variáveis sócio-demográficas das pacientes estão apresentadas na Tabela III e as dos controles na Tabela IV, assim como os respectivos genótipos.

Tabela III – Variáveis sócio-demográficas das pacientes e respectivos genótipos

AMOSTRA	IDADE (anos)	ETNIA	GENÓTIPOS		
			<i>CYP1A1-MspI</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
01	50	C	+/-	-	-
02	75	C	+/+	-	+
03	77	C	+/+	+	-
04	80	C	+/+	+	+
05	75	C	+/+	-	+
06	46	C	+/-	-	+
07	65	C	+/+	-	-
08	38	C	+/+	-	-
09	46	C	+/+	-	-
10	59	C	+/+	+	-
11	57	C	-/-	-	-
12	65	C	+/+	-	-
13	68	C	+/+	-	-
14	51	C	+/-	-	+
15	47	C	+/+	-	+
16	58	C	+/+	-	+
17	66	C	+/+	-	+
18	62	C	+/-	+	-
19	63	C	+/+	+	+
20	55	C	+/+	-	+
21	83	C	+/+	-	+
22	53	C	+/+	-	+
23	58	C	+/+	-	+
24	69	C	+/+	+	+
25	72	C	+/+	-	+
26	69	C	+/-	-	+
27	68	C	+/+	+	+
28	56	A	+/-	-	+
29	74	C	+/+	-	+
30	68	C	+/+	+	-
31	50	C	+/+	+	-

32	30	C	+/-	+	-
33	87	C	+/+	-	+
34	52	C	+/+	+	+
35	62	C	+/+	-	-
36	44	C	+/+	+	-
37	63	C	+/+	+	+
38	73	C	+/+	-	-
39	86	C	+/+	-	-
40	72	C	+/+	+	+
41	39	A	+/-	-	+
42	63	C	+/+	-	-
43	57	C	+/+	-	+
44	60	C	+/-	-	+
45	84	C	+/+	+	+
46	44	C	+/+	+	+
47	77	C	+/+	+	+
48	53	C	+/-	+	+
49	60	C	+/+	-	-
50	44	C	+/-	-	-
51	83	C	+/+	+	+
52	52	C	+/-	-	-
53	57	C	+/-	-	+
54	75	C	+/-	+	+
55	63	C	+/+	-	+
56	72	A	-/-	+	-
57	66	C	+/+	-	-
58	46	C	+/+	+	-
59	59	C	+/+	+	+
60	53	C	+/-	+	+
61	46	C	+/+	-	+
62	69	C	+/-	+	+
63	75	C	+/-	+	-
64	67	C	+/+	+	-
65	52	C	+/+	+	-
66	59	C	+/-	+	+
67	45	C	+/+	+	+
68	53	C	+/+	-	-
69	72	C	+/+	+	+
70	55	C	+/+	-	+
71	51	C	+/+	+	-
72	34	C	+/+	-	+
73	45	C	+/+	+	+
74	53	C	+/-	-	+
75	42	C	+/+	+	+
76	46	C	+/+	-	+
77	56	C	+/+	-	-
78	44	C	+/-	+	+

79	40	C	+/+	+	+
80	72	C	+/+	-	-
81	55	C	+/+	-	+
82	40	C	+/+	+	+
83	27	C	+/+	+	+
84	30	C	+/+	+	+
85	54	C	+/+	+	+

C = Caucasóide; A = Asiático.

Tabela IV – Variáveis sócio-demográficas dos controles e respectivos genótipos

AMOSTRA	IDADE (anos)	ETNIA	GENÓTIPOS		
			<i>CYP1A1-MspI</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
01	45	C	+/-	-	+
02	73	C	+/+	+	-
03	73	C	+/+	+	-
04	75	C	+/+	+	-
05	77	C	+/+	+	+
06	44	C	+/+	-	+
07	60	C	+/+	-	+
08	38	C	+/+	+	+
09	43	C	+/+	-	+
10	56	C	+/+	-	+
11	54	C	+/+	+	+
12	60	C	+/+	-	+
13	65	C	+/+	-	+
14	46	C	+/+	+	+
15	42	C	+/+	-	+
16	55	C	+/+	+	+
17	61	C	+/+	-	+
18	57	C	-/-	-	-
19	59	C	+/+	-	+
20	55	C	+/+	-	+
21	80	C	+/+	-	-
22	58	C	+/+	-	-
23	61	C	+/+	-	+
24	64	C	+/-	+	+
25	72	C	+/-	-	-
26	66	C	+/+	+	-
27	65	C	+/+	+	-
28	54	A	+/+	-	-
29	73	C	+/+	-	-
30	63	C	+/+	-	-
31	45	C	+/+	+	+

32	32	C	+/+	+	+
33	84	C	+/-	-	-
34	47	C	+/+	-	-
35	62	C	+/+	+	-
36	39	C	+/-	-	+
37	58	C	+/-	+	+
38	68	C	+/-	+	+
39	82	C	+/+	-	-
40	72	C	+/+	+	+
41	35	A	+/+	-	+
42	60	C	+/+	+	-
43	52	C	+/+	-	-
44	55	C	+/+	-	+
45	80	C	+/+	-	+
46	40	C	+/+	-	+
47	77	C	+/+	+	-
48	53	C	+/+	+	+
49	56	C	+/+	+	+
50	43	C	+/+	+	-
51	82	C	+/+	-	-
52	47	C	+/+	-	+
53	52	C	+/-	-	+
54	73	C	+/-	-	+
55	58	C	+/+	+	+
56	68	A	+/+	+	-
57	62	C	+/+	+	+
58	43	C	+/-	+	+
59	56	C	+/-	+	+
60	53	C	+/+	+	+
61	43	C	+/+	+	-
62	65	C	+/+	+	+
63	77	C	+/-	-	+
64	62	C	+/-	-	+
65	52	C	+/+	-	+
66	56	C	+/+	-	+
67	40	C	+/+	+	-
68	50	C	+/+	+	-
69	73	C	+/+	+	-
70	50	C	+/+	+	+
71	51	C	+/+	-	+
72	38	C	+/+	+	-
73	41	C	+/-	-	+
74	50	C	+/+	-	+
75	37	C	+/+	-	+
76	43	C	+/+	-	+
77	56	C	+/+	+	+
78	39	C	+/+	-	+

79	37	C	+/-	+	-
80	75	C	+/-	-	+
81	50	C	+/+	-	+
82	36	C	+/+	+	-
83	32	C	+/+	-	-
84	31	C	+/+	-	-
85	52	C	+/+	-	+

C = Caucasóide; A = Asiático.

Entre as pacientes, 63 apresentaram o genótipo homozigoto selvagem (+/+ ou *m1/m1*) do gene *CYP1A1-MspI*; 20 o genótipo heterozigoto (+/- ou *m1/m2*) e duas o genótipo homozigoto mutante (-/- ou *m2/m2*). O genótipo *GSTM1*-positivo foi observado em 40 pacientes e o genótipo *GSTM1*-nulo em 45. O genótipo *GSTT1*-positivo foi identificado em 54 pacientes e o *GSTT1*-nulo em 31.

Entre os controles, 68 apresentaram o genótipo homozigoto selvagem do gene *CYP1A1-MspI*; 16 o genótipo heterozigoto e uma o genótipo homozigoto mutante, sendo que os mesmos apresentaram-se homogeneamente distribuídos nas pacientes e nos controles ($\chi^2_2 = 0,98$; $P > 0,50$). O genótipo *GSTM1*-positivo foi observado em 38 controles, enquanto que o genótipo *GSTM1*-nulo foi identificado em 47. Os mesmos apresentaram-se homogeneamente distribuídos nas pacientes e nos controles ($\chi^2_1 = 0,10$; $P > 0,70$). Os genótipos *GSTT1*-positivo e *GSTT1*-nulo foram observados nos controles com números iguais aos das pacientes (54 e 31, respectivamente).

As freqüências do alelo dominante do gene *CYP1A1-MspI* foram iguais a 0,86 e 0,89 e as do alelo recessivo foram iguais a 0,14 e 0,11, respectivamente nas pacientes e nos controles. As freqüências genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg ($\chi^2_1 = 0,07$; $P > 0,70$ e $\chi^2_1 = 0,03$; $P > 0,80$) respectivamente nas pacientes e nos controles.

Para o gene *GSTM1*, a freqüência de pacientes com genótipos dominantes (+/+ e +/-) foi igual a 0,47 e de homozigotas recessivas (-/-) igual a 0,53. Nos controles, as respectivas freqüências foram iguais a 0,45 e 0,55. Como a técnica

utilizada para detecção deste polimorfismo, bem como do gene *GSTT1*, não possibilita a identificação de heterozigotos, foi estimada a frequência dos mesmos em 0,39 nas pacientes e 0,38 nos controles.

Para o gene *GSTT1* observou-se as mesmas frequências nas pacientes e nos controles: 0,64 com genótipos dominantes (+/+ e +/-) e 0,36 homozigotas recessivas (-/-). A estimativa de heterozigotos foi igual a 0,48 nas duas amostras.

5.2 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Não houve associação entre os genótipos estudados e a susceptibilidade ao câncer de mama. As razões de probabilidade calculadas foram: OR = 1,40 (IC 95% = 0,68-2,87) para o polimorfismo *CYP1A1-MspI*; OR = 0,91 (IC 95% = 0,50-1,66) para o polimorfismo do *GSTM1*; e OR = 1,00 (IC 95% = 0,54-1,87) para o polimorfismo do *GSTT1*.

Ao calcular as razões de probabilidade considerando os genótipos considerados de risco em conjunto também não foram encontradas associações com o câncer de mama: OR = 0,56 (IC 95% = 0,26-1,24) para mulheres com um genótipo considerado de risco e OR = 0,99 (IC 95% = 0,41-2,37) para mulheres com dois genótipos considerados de risco.

Não calculamos o OR para mulheres com três genótipos considerados de risco pois o número de pacientes e controles com esta combinação não foi suficiente para uma análise apropriada.

5.3 PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Os parâmetros clínicos das pacientes e dos controles (idade da menarca, idade da menopausa e tempo de uso de pílulas anticoncepcionais) estão apresentados nas Tabelas V e VI, respectivamente. Parâmetros histopatológicos relativos aos tumores

(grau do carcinoma, tamanho do tumor e envolvimento dos linfonodos regionais) das pacientes estão apresentados na Tabela V.

Tabela V – Parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes

AMOSTRA	MENARCA	MENOPAUSA	PÍLULA	GRAU	TAMANHO (mm)	LINFONODO
01	15	45	S.I.	II	S.I.	Não
02	S.I.	47	S.I.	II	30	Sim
03	S.I.	50	N	II	70	Sim
04	13	55	N	I	7	Não
05	16	42	S.I.	I	23	Não
06	10	46	S.I.	II	45	Sim
07	16	53	N	II	20	Sim
08	S.I.	S.I.	S.I.	II	S.I.	S.I.
09	17	45	N	II	25	Sim
10	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.
11	12	53	10a	II	20	Não
12	14	46	S.I.	III	40	Não
13	12	49	S.I.	II	20	Sim
14	S.I.	48	S.I.	II	80	Sim
15	11	S.I.	2a	III	S.I.	Sim
16	13	50	1a	II	10	Não
17	12	50	20a	II	8	Sim
18	12	54	N	II	25	Não
19	15	57	6m	II	20	Sim
20	S.I.	50	S.I.	II	20	Sim
21	14	50	S.I.	I	15	Não
22	13	48	2a	II	15	Sim
23	13	45	S.I.	II	19	Não
24	11	S.I.	N	II	20	Não
25	15	55	N	III	S.I.	Não
26	S.I.	46	S.I.	II	30	Sim
27	12	40	N	II	35	Sim
28	13	49	S.I.	III	S.I.	Sim
29	09	50	N	II	23	Não
30	12	55	N	II	S.I.	Não
31	15	50	S.I.	I	20	Não
32	11	S.I.	S	I	16	Não
33	16	54	N	II	83	Sim
34	13	51	8a	II	30	Não
35	12	55	13a	II	8	S.I.
36	12	44	21a	III	32	Não
37	12	45	S.I.	S.I.	40	Sim
38	13	54	N	II	60	Sim
39	11	49	N	II	34	Não

40	11	35	N	S.I.	8	Não
41	12	S.I.	1a	II	20	Sim
42	13	48	2a	II	20	Não
43	16	49	S.I.	I	35	Não
44	15	48	S.I.	S.I.	35	Não
45	12	50	N	I	30	Não
46	12	44	10a	II	S.I.	Não
47	15	50	N	II	30	Sim
48	S.I.	43	S.I.	III	20	Não
49	11	50	5a	I	25	Não
50	13	S.I.	S	II	27	Não
51	15	49	N	II	45	Sim
52	12	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.
53	12	53	10a	II	20	Não
54	11	50	N	III	S.I.	S.I.
55	12	50	N	III	40	Sim
56	12	55	N	I	40	Sim
57	11	S.I.	N	S.I.	50	Sim
58	11	S.I.	5a	II	25	Sim
59	12	53	10a	III	S.I.	Sim
60	15	53	N	II	16	Não
61	15	50	N	II	60	Sim
62	11	40	10a	I	12	Não
63	13	53	N	I	15	Não
64	13	50	20a	II	30	Não
65	14	48	N	I	35	Sim
66	17	46	N	I	12	Não
67	15	45	N	III	13	Sim
68	13	52	20a	I	18	Não
69	15	47	S.I.	III	35	Sim
70	11	48	4m	II	50	Sim
71	15	45	25a	III	15	Não
72	13	S.I.	3a	II	30	Não
73	16	S.I.	S	II	50	Sim
74	11	50	8m	II	40	Sim
75	12	S.I.	11a	I	15	Não
76	15	45	S.I.	II	50	Sim
77	13	54	N	II	30	Sim
78	15	45	16a	S.I.	S.I.	S.I.
79	16	-	N	II	35	Sim
80	13	52	N	I	S.I.	S.I.
81	13	40	N	II	S.I.	S.I.
82	14	-	N	S.I.	S.I.	S.I.
83	13	-	7a	S.I.	S.I.	S.I.
84	15	-	N	S.I.	S.I.	S.I.
85	15	44	2a	S.I.	S.I.	S.I.

N = não; a = anos; m = meses; S.I. = sem informação.

Tabela VI – Parâmetros clínicos dos controles

AMOSTRA	MENARCA	MENOPAUSA	PÍLULA
01	14	-	3a
02	S.I.	S.I.	N
03	13	48	N
04	15	45	2a
05	16	60	S
06	14	35	12a
07	12	48	N
08	S.I.	S.I.	S.I.
09	S.I.	S.I.	S.I.
10	S.I.	S.I.	S.I.
11	S.I.	S.I.	S.I.
12	13	55	N
13	S.I.	S.I.	S.I.
14	13	-	3a
15	15	-	20a
16	S.I.	S.I.	S.I.
17	14	56	1a
18	S.I.	S.I.	S.I.
19	12	47	N
20	S.I.	S.I.	S.I.
21	14	54	N
22	12	50	N
23	S.I.	S.I.	S.I.
24	14	48	N
25	S.I.	S.I.	S.I.
26	13	60	N
27	S.I.	S.I.	S.I.
28	12	49	2a
29	14	45	N
30	14	46	N
31	12	-	N
32	S.I.	S.I.	S.I.
33	S.I.	S.I.	N
34	S.I.	S.I.	S.I.
35	13	50	10a
36	S.I.	S.I.	S.I.
37	S.I.	S.I.	S.I.
38	15	40	N
39	12	39	N
40	13	S.I.	N
41	S.I.	S.I.	S.I.
42	S.I.	S.I.	S.I.
43	S.I.	S.I.	S.I.
44	S.I.	S.I.	S.I.

45	15	45	N
46	S.I.	S.I.	S.I.
47	13	50	N
48	S.I.	S.I.	S.I.
49	12	57	5a
50	15	-	S
51	12	46	N
52	14	44	N
53	S.I.	S.I.	S.I.
54	13	45	N
55	11	53	N
56	11	40	5a
57	15	50	N
58	S.I.	S.I.	S.I.
59	S.I.	S.I.	S.I.
60	S.I.	S.I.	S.I.
61	11	-	4a
62	11	43	N
63	13	54	20a
64	13	50	N
65	S.I.	S.I.	S.I.
66	S.I.	S.I.	S.I.
67	S.I.	S.I.	S.I.
68	S.I.	S.I.	S.I.
69	13	50	6m
70	11	52	N
71	S.I.	S.I.	S.I.
72	S.I.	S.I.	S.I.
73	S.I.	S.I.	S.I.
74	S.I.	S.I.	S.I.
75	S.I.	S.I.	S.I.
76	11	-	N
77	S.I.	S.I.	S.I.
78	S.I.	S.I.	S.I.
79	S.I.	S.I.	S.I.
80	15	50	N
81	13	46	27a
82	S.I.	S.I.	S.I.
83	S.I.	S.I.	S.I.
84	S.I.	S.I.	S.I.
85	14	51	2m

N = não; a = anos; m = meses; S.I. = sem informação.

Os questionários utilizados nas entrevistas foram avaliados para obter-se informações sobre a atividade hormonal (do estrogênio) nas mulheres do estudo,

sendo que os parâmetros clínicos analisados foram: idade da menarca, idade da menopausa, o tempo (em anos) decorrido entre a menarca e a menopausa (tempo médio de exposição ao estrogênio) e o tempo de uso de pílulas anticoncepcionais (também avaliando a exposição ao estrogênio).

Considerando que nem todas as mulheres responderam a todas as questões do questionário, muitas vezes por não se lembrarem das respostas, o número amostral varia nos cálculos dos diferentes parâmetros.

Nas pacientes (n = 77) a idade média de menarca foi de $13,17 \pm 1,79$ anos e nos controles (n = 43) foi $13,14 \pm 1,36$ anos ($t = 0,09$; $P > 0,90$). A idade média da menopausa foi de $48,74 \pm 4,32$ anos nas pacientes (n = 68) e $48,60 \pm 5,66$ anos nos controles (n = 35) ($t = 1,40$; $P > 0,10$). O tempo médio de exposição ao estrogênio endógeno, isto é, o tempo entre a menarca e a menopausa, foi de $35,60 \pm 4,80$ anos nas pacientes (n = 62) e $35,43 \pm 5,73$ anos nos controles (n = 35) ($t = 0,16$; $P > 0,80$).

Em relação ao uso de pílulas anticoncepcionais, 30 pacientes afirmaram já terem utilizado, sendo que 27 relataram o tempo de utilização, e 33 declararam nunca terem feito uso de contraceptivos orais. Entre os controles, 17 afirmaram terem utilizado pílula anticoncepcional, sendo que 15 relataram o tempo de utilização, e 28 declararam nunca terem utilizado. Assim, a média de tempo de utilização de pílula anticoncepcional nas pacientes (n = 27) foi de $8,72 \pm 7,46$ anos e nos controles (n = 15) $7,64 \pm 8,41$ anos ($t = 0,44$; $P > 0,60$).

Foi avaliada a significância das diferenças das idades médias da menarca, da menopausa, do tempo médio entre a menopausa e a menarca e do uso de pílulas anticoncepcionais das pacientes e dos controles com genótipos considerados de risco (*CYP1A1-MspI* +/- e -/-, *GSTM1*- e *GSTT1*-). Os resultados estão apresentados nas Tabelas VII, VIII e IX, onde se observa também os valores de OR.

Tabela VII – Média e OR dos parâmetros clínicos nas mulheres com genótipo *CYP1A1-MspI +/- e -/-*

<i>CYP1A1-MspI +/- e -/-</i>	Menarca		Menopausa		Menopausa - Menarca	
	P (19)	C (7)	P (18)	C (6)	P (15)	C (6)
Média	12,74 ± 1,85	13,86 ± 0,90	48,72 ± 4,23	47,83 ± 4,83	36,40 ± 5,00	34,00 ± 5,37
Teste t	1,51; P > 0,10		0,43; P > 0,60		0,98; P > 0,30	
OR (IC 95%)	1,68 (0,64 - 4,41)		1,74 (0,62 - 4,88)		1,54 (0,54 - 4,43)	

P = pacientes; C = controles; (n) = número de indivíduos.

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as médias nos genótipos *CYP1A1-MspI +/- e -/-*. Não foi calculado o tempo médio de uso de pílula anticoncepcional para estes genótipos considerados de risco pois havia informação de apenas dois controles, impossibilitando a realização de um teste estatístico.

Tabela VIII – Média e OR dos parâmetros clínicos nas mulheres com genótipo *GSTM1-nulo*

<i>GSTM1-nulo</i>	Menarca		Menopausa		Pílula		Menopausa - Menarca	
	P (40)	C (23)	P (38)	C (20)	P (14)	C (8)	P (34)	C (20)
Média	13,03 ± 1,83	13,26 ± 1,14	49,16 ± 3,49	47,75 ± 5,19	6,43 ± 7,01	10,65 ± 10,56	36,12 ± 4,32	34,50 ± 5,26
Teste t	$t' = 0,62 < t_c = 2,07^*$		$t' = 1,09 < t_c = 2,08^*$		1,12; P > 0,20		1,23; P > 0,20	
OR (IC 95%)	0,94 (0,45 - 1,99)		0,95 (0,42 - 2,16)		0,94 (0,27 - 3,34)		0,91 (0,39 - 2,10)	

P = pacientes; C = controles; (n) = número de indivíduos.

* Não significante a 0,05.

Também não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as médias analisadas no genótipo *GSTM1-nulo*.

Tabela IX – Média e OR dos parâmetros clínicos nas mulheres com genótipo *GSTT1*-nulo_

<i>GSTT1</i> -	Menarca		Menopausa		Pílula		Menopausa - Menarca	
	P (28)	C (16)	P (24)	C (14)	P (9)	C (6)	P (23)	C (14)
Média	12,89 ± 1,57	12,94 ± 1,21	50,38 ± 3,56	48,00 ± 5,32	13,44 ± 8,38	3,92 ± 3,38	37,22 ± 4,51	35,07 ± 5,15
Teste t	0,11; P > 0,90		1,68; P > 0,10		2,61; P < 0,05		1,36; P > 0,10	
OR (IC 95%)	0,96 (0,45 – 2,09)		0,82 (0,35 – 1,89)		0,75 (0,20 – 2,77)		0,88 (0,38 – 2,07)	

P = pacientes; C = controles; (n) = número de indivíduos.

Na análise do genótipo *GSTT1*-nulo detectou-se que o tempo médio do uso de pílulas anticoncepcionais foi maior nas pacientes do que nos controles, sendo a diferença estatisticamente significante.

Analisamos a possibilidade de um efeito interativo dos três genes estudados na susceptibilidade ao câncer de mama. Para isso, os indivíduos foram classificados de acordo com o número de genótipos considerados de risco (*CYP1A1*-*MspI* +/- e -/-, *GSTM1*-, *GSTT1*-) que possuíam e comparados com os indivíduos que eram selvagens para os três genes estudados. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas X e XI.

Tabela X – Média e OR dos parâmetros clínicos em mulheres com um genótipo considerado de risco

	Menarca		Menopausa		Pílula		Menopausa - Menarca	
	P (29)	C (22)	P (30)	C (18)	P (12)	C (10)	P (26)	C (18)
Média	13,38 ± 1,97	13,32 ± 1,32	48,07 ± 3,94	47,67 ± 6,00	10,45 ± 9,32	8,18 ± 9,13	34,58 ± 4,47	34,28 ± 6,24
Teste t	0,12; P > 0,90		<i>t</i> ' = 0,25 < <i>tc</i> = 2,10*		0,58; P > 0,50		0,19; P > 0,80	
OR (IC 95%)	0,56 (0,22 – 1,47)		0,71 (0,23 – 2,19)		0,34 (0,06 -2,04)		0,62 (0,20 – 1,92)	

P = pacientes; C = controles; (n) = número de indivíduos.

* Não significante a 0,05.

Tabela XI – Média e OR dos parâmetros clínicos em mulheres com dois genótipos considerados de risco

	Menarca		Menopausa		Menopausa - Menarca	
	P (23)	C (12)	P (22)	C (11)	P (20)	C (11)
Média	12,61 ± 1,67	13,17 ± 1,03	50,41 ± 3,22	48,00 ± 4,38	37,95 ± 3,85	34,91 ± 4,21
Teste t	1,04; P > 0,30		1,77; P > 0,10		2,04; P > 0,05	
OR (IC 95%)	0,82 (0,29 – 2,34)		0,86 (0,26 – 2,84)		0,78 (0,23 – 2,60)	

P = pacientes; C = controles; (n) = número de indivíduos.

Nenhum dos resultados apresentados nas duas tabelas acima foi estatisticamente significativa.

Para a análise dos indivíduos com dois genótipos considerados de risco não foi calculado o tempo de uso de pílula anticoncepcional pois havia informação de apenas três controles, impossibilitando a realização de um teste estatístico.

Não foi possível analisar o efeito dos três genótipos considerados de risco devido a poucos indivíduos apresentarem esta combinação (4 pacientes e 3 controles).

Também realizamos uma comparação entre as pacientes com um genótipo considerado de risco com as pacientes com dois genótipos considerados de risco para verificar se havia alguma diferença significativa entre elas nos diferentes parâmetros estudados. Os resultados estão na tabela abaixo:

Tabela XII – Média dos parâmetros clínicos em pacientes com um e com dois genótipos considerados de risco

	Menarca		Menopausa		Pílula		Menopausa - Menarca	
	P ₁ (29)	P ₂ (23)	P ₁ (30)	P ₂ (22)	P ₁ (12)	P ₂ (7)	P ₁ (26)	P ₂ (20)
Média	13,38 ± 1,97	12,61 ± 1,67	48,40 ± 3,64	50,41 ± 3,22	10,44 ± 9,33	7,39 ± 7,28	34,58 ± 4,47	37,95 ± 3,85
Teste t	1,48; P > 0,10		2,05; P < 0,05		0,73; P > 0,40		2,67; P < 0,05	

P₁= pacientes com um genótipo considerado de risco; P₂= pacientes com dois genótipos considerados de risco; (n) = número de indivíduos.

A média da idade da menopausa das pacientes com dois genótipos considerados de risco foi significativamente maior do que as pacientes com um genótipo considerado de risco, o que também resultou na diferença significativa do tempo entre a menarca e a menopausa.

Nas pacientes, os diferentes genótipos de cada gene estudado também foram analisados em função da gravidade do estado clínico das mesmas, através dos parâmetros histopatológicos: tamanho do tumor (mm), grau histológico do carcinoma (I, II ou III), e envolvimento de linfonodos regionais. Os dados estão apresentados nas Tabelas XIII, XIV e XV, respectivamente.

Tabela XIII – Média do tamanho dos tumores nos diferentes genótipos da amostra de pacientes

	<i>CYP1A1-MspI</i>		<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>	
	+/+ (50)	+/- -/(17)	+(30)	-(37)	+(42)	-(25)
Média	30,02 ± 16,40	27,82 ± 16,90	26,53 ± 13,94	31,84 ± 18,04	29,86 ± 17,67	28,80 ± 14,42
Teste t	0,47; P > 0,60		1,33; P > 0,10		0,26; P > 0,70	

(n) = número de indivíduos.

As médias dos tamanhos dos tumores não diferiram significativamente entre pacientes com genótipos considerados de risco e pacientes com genótipos selvagens.

Tabela XIV – Grau histológico dos carcinomas nos diferentes genótipos da amostra de pacientes

	<i>CYP1A1-MspI</i>		<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>	
	+/+ (54)	+/- -/(19)	+(31)	-(42)	+(46)	-(27)
I	11	5	9	6	8	8
II	34	11	15	31	29	16
III	9	3	7	5	9	3
	$\chi^2_2 = 0,34$; P > 0,80		$\chi^2_2 = 5,65$; P > 0,05		$\chi^2_2 = 1,86$; P > 0,30	

(n) = número de indivíduos.

Os graus dos carcinomas observados se distribuíram homogeneamente entre os genótipos considerados de risco e os genótipos selvagens.

Tabela XV – Envolvimento de linfonodos nos diferentes genótipos da amostra de pacientes

	<i>CYP1A1-MspI</i>		<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>	
	+/+ (54)	+/- -/-(19)	+ (33)	- (39)	+ (47)	- (25)
Sim	29	7	14	21	26	9
Não	25	12	19	18	21	16
	$\chi^2_1 = 1,60; P > 0,20$		$\chi^2_1 = 1,14; P > 0,20$		$\chi^2_1 = 1,89; P > 0,10$	

(n) = número de indivíduos.

A presença ou ausência de linfonodos regionais também se distribuiu homogeneamente entre as pacientes com genótipos considerados de risco e as pacientes com genótipos selvagens. Assim, não houve diferença significativa entre os diferentes genótipos para nenhum dos parâmetros histopatológicos analisados.

A comparação das médias dos tamanhos dos tumores observados nas pacientes com genótipos considerados de risco com as pacientes com genótipos selvagens (*CYP1A1-MspI* +/+, *GSTM1*+, *GSTT1*+) apresentou os seguintes resultados: pacientes com genótipos selvagens (n = 15), média = $27,53 \pm 13,19$; pacientes com um genótipo considerado de risco (n = 27), média = $29,56 \pm 18,82$ ($t = 0,38$; $P > 0,70$); pacientes com dois genótipos considerados de risco (n = 23), média = $31,13 \pm 16,46$ ($t = 0,72$; $P > 0,40$). Ao comparar a média das pacientes com um genótipo considerado de risco com a das pacientes com dois genótipos considerados de risco, o valor de t foi igual a 0,31; $P > 0,70$.

O número de pacientes com carcinomas de diferentes graus histológicos e com a presença ou ausência de linfonodos regionais, mostrou-se homogeneamente distribuído nas diferentes análises: 1) pacientes com um genótipo considerado de risco e pacientes com genótipos selvagem ($\chi^2_2 = 0,37$; $P > 0,80$ e $\chi^2_1 = 1,04$; $P > 0,30$, respectivamente para graus histológicos e envolvimento de linfonodos); 2) pacientes com dois genótipos considerados de risco e pacientes com genótipos selvagem ($\chi^2_2 = 3,14$; $P > 0,20$ e $\chi^2_1 = 0,02$; $P > 0,80$, respectivamente para graus histológicos e para envolvimento de linfonodos) e 3) pacientes com um genótipo considerado de risco e pacientes com dois genótipos considerados de risco ($\chi^2_2 =$

1,86; $P > 0,30$ e $\chi^2_1 = 0,90$; $P > 0,30$, respectivamente para graus histológicos e para envolvimento de linfonodos).

5.4 COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA

Foi realizada a comparação das frequências genóticas encontradas neste estudo com outras descritas na literatura, apresentadas nas tabelas XVI, XVII e XVIII. Os trabalhos utilizados para esta comparação possuem dados de amostras de populações caucasóides, considerando que a amostra de pacientes e de controles deste estudo possui apenas 3 indivíduos asiáticos.

Tabela XVI - Frequências genóticas de *CYP1A1-MspI* em populações caucasóides, segundo dados da literatura

<i>CYP1A1-MspI</i>	A		B		C'	
	P	C (4453)	P (413)	C (415)	P (85)	C (85)
+/+	S.I	82,4% (3670)	79,2% (327)	78,3% (325)	74,1% (63)	80,0% (68)
+/-	S.I	16,4% (729)	18,9% (78)	20,0% (83)	23,5% (20)	18,8% (16)
-/-	S.I	1,2% (54)	1,9% (8)	1,7% (7)	2,4% (2)	1,2% (1)

P = pacientes; C = controles; S.I. = sem informação; (n) = número de indivíduos.

A: adaptado de GARTE et al., 2001; B: adaptado de LI et al., 2004; C': presente estudo.

O resultado do teste de qui-quadrado para o gene *CYP1A1-MspI* foi de $\chi^2_2 = 1,06$; $P > 0,50$ para as pacientes e $\chi^2_4 = 4,73$; $P > 0,30$ para os controles, indicando que as frequências analisadas estão homogeneamente distribuídas. O estudo A não apresentava informações sobre pacientes, então só foi utilizado para o teste dos controles.

Tabela XVII - Frequências genótípicas de *GSTM1* em populações caucasóides, segundo dados da literatura

<i>GSTM1</i>	A		B		C'		D	
	P (157)	C (157)	P (481)	C (478)	P (79)	C (123)	P (85)	C (85)
+/+ e	42,0%	51,0%	54,1%	58,2%	58,2%	47,2%	47,1%	44,7%
+/-	(66)	(80)	(260)	(278)	(46)	(58)	(40)	(38)
-/-	58,0%	49,0%	45,9%	41,8%	41,8%	52,8%	52,9%	55,3%
	(91)	(77)	(221)	(200)	(33)	(65)	(45)	(47)

P = pacientes; C = controles; (n) = número de indivíduos.

A: adaptado de MATHESON et al., 2002; B: adaptado de MITRUNEN et al., 2001; C': adaptado de AMORIM et al., 2002; D: presente estudo.

Analisando as frequências do genótipos do gene *GSTM1* obtivemos $\chi^2_3 = 8,98$; $P < 0,05$ para as pacientes e $\chi^2_3 = 9,18$; $P < 0,05$, indicando que as frequências genótípicas não se apresentaram homoganeamente distribuídas nas diferentes amostras populacionais consideradas, tanto de pacientes como de controles.

Tabela XVIII - Frequências genótípicas de *GSTT1* em populações caucasóides, segundo dados da literatura

<i>GSTT1</i>	A		B		C'		D	
	P (157)	C (157)	P (79)	C (123)	P (717)	C (767)	P (85)	C (85)
+/+ e	72,0%	88,5%	81,0%	74,8%	61,8%	70,7%	63,5%	63,5%
+/-	(113)	(139)	(64)	(92)	(443)	(542)	(54)	(54)
-/-	28,0%	11,5%	19,0%	25,2%	38,2%	29,3%	36,5%	36,5%
	(44)	(18)	(15)	(31)	(274)	(225)	(31)	(31)

P = pacientes; C = controles; (n) = número de indivíduos.

A: adaptado de MATHESON et al., 2002; B: adaptado de AMORIM et al., 2002; C': adaptado de VAN DER HEL et al., 2005; D: presente estudo.

Para *GSTT1*, os resultados foram $\chi^2_3 = 15,58$; $P < 0,01$ para as pacientes e $\chi^2_3 = 25,45$; $P < 0,001$ para os controles, indicando que, como aconteceu para o gene *GSTM1*, as frequências genótípicas não se apresentaram homoganeamente distribuídas, tanto nas pacientes como nos controles.

6 DISCUSSÃO

Muitos estudos em doenças humanas complexas estão sendo realizados objetivando um melhor conhecimento sobre as bases genéticas e moleculares destas doenças. Com os avanços da biologia molecular, proporcionando abordagens moleculares com maior poder de resolução, espera-se que a compreensão da susceptibilidade genética e da interação entre os fatores genéticos e ambientais esclareçam novos aspectos sobre a etiologia dos cânceres humanos, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de procedimentos mais eficazes na prevenção e no tratamento destas importantes doenças, responsáveis por uma ponderável morbidade e mortalidade das populações humanas.

Resultados obtidos em estudos sobre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao câncer de mama, avaliando também o efeito de diferentes fatores ambientais, vêm proporcionando uma melhor compreensão da doença. Já são conhecidos muitos fatores de risco envolvidos na origem e progressão do câncer de mama por influenciar o tempo de exposição da mulher ao estrogênio endógeno, como por exemplo, a idade da menarca, idade da menopausa e idade da primeira gravidez (PARK et al., 2003), e também fatores que aumentam a exposição ao estrogênio exógeno, como o uso de pílulas anticoncepcionais e os tratamentos de reposição hormonal (COLLINS et al., 2005). Assim, a análise de polimorfismos genéticos relacionados com a atividade enzimática de ativação e detoxificação de carcinógenos aliada a fatores ambientais de risco já conhecidos, pode fornecer importantes informações para a avaliação do risco de desenvolvimento da doença.

Apesar do risco de desenvolver câncer de mama por alterações genéticas nos genes do biometabolismo não ser tão relevante como o determinado por mutações em genes de alta penetrância, como o *BRCA1* e o *BRCA2*, os genes do biometabolismo incluem uma percentagem maior de indivíduos, podendo gerar um maior impacto epidemiológico nas populações humanas.

Neste trabalho foram analisados polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* e a susceptibilidade ao câncer de mama esporádico, em um estudo tipo caso-controle, pareado por idade e grupo étnico. A escolha destes genes, em especial do polimorfismo *CYP1A1-MspI* e das deleções nos genes *GSTM1* e *GSTT1*, deve-se ao seu potencial como marcadores de susceptibilidade para diferentes tipos de câncer, e por serem genes que participam da via metabólica do estrogênio endógeno e exógeno, indicando indivíduos ou populações com diferenças genéticas capazes de modular a susceptibilidade ao câncer de mama, como será referido extensivamente no desenvolvimento desta Discussão.

No presente estudo, pacientes e controles tiveram médias de idade semelhantes ($58,60 \pm 13,67$ e $56,05 \pm 13,59$, respectivamente, $t = 1,22$; $P > 0,20$) e em ambas as amostras apenas 3 (3,5%) mulheres eram de origem não caucasóide, o que demonstra a pertinência do pareamento proposto de acordo com os critérios inicialmente estabelecidos.

As frequências genótípicas observadas para o gene *CYP1A1-MspI*, tanto nas pacientes como nos controles, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg ($\chi^2_1 = 0,07$; $P > 0,70$ e $\chi^2_1 = 0,03$; $P > 0,80$, respectivamente), demonstrando que ambas as amostras são representativas de populações em equilíbrio genético.

Como nos referimos nos Resultados, considerando que existe uma relação de dominância entre os alelos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e que a técnica utilizada não permite a identificação dos heterozigotos, não há possibilidade de obter-se, por contagem direta, a frequência de heterozigotos que constituem a amostra. No entanto, há possibilidade de estimar a frequência dos mesmos, desde que assumamos como pressuposto básico que o caráter sob estudo esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg. De acordo com as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1994) a referida estimativa é feita considerando a frequência de homozigotos recessivos, que foi igual, para o gene *GSTM1*, a 0,53 nas pacientes e 0,55 nos controles. A frequência do alelo q é estimada pela raiz quadrada de q^2 que é igual a 0,73 para as

pacientes e 0,74 para os controles. Em consequência, estima-se a frequência do alelo dominante, p , em $1 - q = 0,27$ e $0,26$, respectivamente, e a de heterozigotos ($2pq$) igual a $0,39$ para a amostra de pacientes e $0,38$ para a amostra controle. Para o gene *GSTT1* esta estimativa foi igual a $0,48$ tanto nas pacientes como nos controles. É possível também estimar a proporção de genótipos heterozigotos (+/-) contidos nos genótipos dominantes (+/+ e +/-). Esta estimativa é feita através da fórmula $2q/1+q$ que aplicada aos dados de nossas amostras, indica que $0,84$ e $0,85$ dos indivíduos com genótipos dominantes para o gene *GSTM1* são heterozigotos, respectivamente nas pacientes e nos controles. Para o gene *GSTT1* esta estimativa indicou uma proporção de $0,65$ de heterozigotos entre as pacientes e controles com genótipo dominante. Todas estas estimativas são importantes por permitirem um conhecimento mais efetivo das distribuições genótípicas nas amostras estudadas e, em consequência, da dinâmica gênica nas populações humanas.

O estudo de associação não demonstrou resultados significativos entre os genótipos estudados e a susceptibilidade ao câncer de mama: *CYP1A1-MspI* OR = $1,40$ (IC 95% = $0,68-2,87$), *GSTM1* OR = $0,91$ (IC 95% = $0,50-1,66$), *GSTT1* OR = $1,00$ (IC 95% = $0,54-1,87$). Estes dados estão de acordo com outros descritos na literatura. Para o gene *CYP1A1-MspI*, TAIOLI et al. (1995) e BAILEY et al. (1998) analisaram populações caucasóides americanas e AMORIM et al. (2002) analisando uma população caucasóide brasileira (OR = $0,91$; IC 95% = $0,49-1,66$) não encontraram uma associação positiva com o câncer de mama.

Em relação ao gene *GSTM1*, o genótipo nulo não foi associado ao desenvolvimento de câncer de mama em populações caucasóides nos estudos de AMBROSONE et al. (1999) (OR = $0,9$; IC 95% = $0,4-1,9$), GARCIA-CLOSAS et al. (1999) (OR = $1,05$; IC 95% = $0,80-1,37$), MILLIKAN et al. (2000) (OR = $0,9$; IC 95% = $0,7-1,2$), AMORIM et al. (2002) (OR = $0,64$; IC 95% = $0,36-1,13$), entre outros. O estudo recente de VAN DER HEL et al. (2005) também não encontrou associação do genótipo *GSTM1*-nulo com o câncer de mama (OR = $1,14$; IC 95% = $0,93-1,42$).

Também não foi descrita a associação entre o gene *GSTT1*-nulo e câncer de mama por HELZLSOUER et al. (1998) (OR = 1,50; IC 95% = 0,76-2,95), MILLIKAN et al. (2000) (OR = 0,8; IC 95% = 0,6-1,2) e AMORIM et al. (2002) (OR = 0,70; IC 95% = 0,35-1,39). BAILEY et al. (1998) analisaram outros genes além do *GSTT1*, mas não encontraram associação deles separadamente ou combinados com o câncer de mama em uma população caucasóide.

Entretanto, muitos estudos tipo caso-controle apresentam resultados controversos, determinando que o tamanho amostral seja um procedimento metodológico importante para a obtenção de informações mais consistentes. Além disso, muitos estudos vêm demonstrando que as frequências alélicas dos genes do biometabolismo diferem substancialmente em diferentes etnias e/ou regiões geográficas específicas, o que contribui para a inconsistência dos resultados descritos.

O estudo de TAIOLI et al. (1995), como acima foi referido, não demonstrou associação do *CYP1A1-MspI* com o câncer de mama em mulheres caucasóides. No entanto, associação foi descrita para este mesmo polimorfismo em mulheres afro-americanas (OR = 9,7; IC 95% = 2,0-47,9). Associação do *CYP1A1-MspI* com o câncer de mama também foi observada por HUANG et al. (1999), em mulheres chinesas pós-menopausa (OR = 1,98; IC 95% = 1,01-3,99). O hábito tabagista foi também associado positivamente (OR = 5,65; IC 95% = 1,50-21,3) ao câncer de mama por ISHIBE et al. (1998) num estudo do polimorfismo *MspI* do gene *CYP1A1* em uma amostra da população caucasóide dos Estados Unidos.

Por outro lado, no estudo de AMORIM et al. (2002), realizado com uma população brasileira da área metropolitana do Rio de Janeiro, o alelo de risco do gene *CYP1A1-MspI* foi observado com uma baixa frequência em mulheres não-brancas, e o resultado da análise estatística sugeriu que este alelo poderia diminuir o risco de desenvolver câncer de mama, atuando como um alelo protetor.

Associações com o genótipo nulo do gene *GSTM1* e o câncer de mama foram descritas por HELZLSOUER et al. (1998), CHARRIER et al. (1999), PARK et al.

(2000) e MITRUNEN et al. (2001). Os dois primeiros autores encontraram um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres caucasóides em pós-menopausa (OR = 2,50; IC 95% = 1,34-4,65 e OR = 1,99; IC 95% = 1,19-3,32, respectivamente). No estudo de PARK et al. (2000) a associação positiva (OR = 2,0; IC 95% = 1,0-3,7) foi observada numa amostra de mulheres da população coreana, enquanto que MITRUNEN et al. (2001) a detectou em amostras da população caucasóide da Finlândia (OR = 1,49; IC 95% = 1,03-2,15). Entretanto, ROODI et al. (2004) encontraram um efeito protetor do genótipo *GSTM1*-nulo. Mulheres caucasóides americanas homozigotas selvagens apresentavam um risco elevado de desenvolver câncer de mama (OR = 2,8; IC 95% = 1,45-5,59).

Quanto ao gene *GSTT1*, MATHESON et al. (2002) encontraram o genótipo nulo associado com o câncer de mama em mulheres em pré-menopausa (OR = 3,15; IC 95% = 1,7-5,8) e MITRUNEN et al. (2001) também observaram esta tendência, porém sem significância estatística. Estes resultados sugerem que o gene *GSTT1* desempenhe um papel inicial no desenvolvimento do câncer de mama. Recentemente, VAN DER HEL et al. (2005) descreveram a associação do *GSTT1*-nulo com o câncer de mama em mulheres holandesas, sendo que as que apresentaram este genótipo tinham um risco 30% maior (OR = 1,30; IC 95% = 1,04-1,64) do que as mulheres com genótipo *GSTT1*-positivo.

Porém, GARCIA-CLOSAS et al. (1999) encontraram um efeito protetor para o genótipo nulo, onde mulheres em pré-menopausa *GSTT1*-nulas apresentaram um menor risco de desenvolver câncer de mama (OR = 0,23; IC 95% = 0,07-0,81).

Muitos estudos analisam a combinação de diferentes genes e seus genótipos considerados de risco, com o objetivo de analisar o efeito interativo dos genes. HELZLSOUER et al. (1998) encontraram um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama associado com o aumento do número de genótipos considerados de risco dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* (OR = 3,77; IC 95% = 1,10-12,88). PARK et al. (2000) também encontraram um maior risco associado aos genótipos *GSTM1*-nulo e *GSTT1*-nulo (OR = 2,2; IC 95% = 1,1-4,5). No presente estudo, analisamos

pacientes e controles com um genótipo considerado de risco e com dois genótipos considerados de risco, não tendo sido observadas associações estatisticamente significativas, tanto positivas como negativas.

A análise de parâmetros clínicos no que se refere à idade média da menarca, idade média da menopausa, tempo médio entre a menarca e a menopausa e tempo médio de uso de pílulas anticoncepcionais (considerados fatores de risco) dos genótipos considerados de risco das pacientes e dos controles não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa, sugerindo, no nosso estudo, que estes parâmetros não são relevantes para o desenvolvimento do câncer mamário. No entanto, deve-se considerar que algumas pacientes e controles não responderam completamente nos questionários as informações clínicas, determinando que, para determinados parâmetros, o tamanho amostral ficasse ainda mais reduzido e, portanto, que os resultados acima sejam interpretados com cautela. O mesmo deve ser considerando para o resultado estatisticamente significativo ($t = 2,61$; $P < 0,05$) observado quando comparamos o tempo médio de uso de pílulas anticoncepcionais das pacientes e controles com o genótipo *GSTT1*-nulo.

Quando realizamos a comparação entre pacientes que possuíam um genótipo considerado de risco com pacientes com dois genótipos considerados de risco foi observado que a média da idade da menopausa das últimas foi significativamente maior do que a das pacientes com um genótipo considerado de risco ($t = 2,05$; $P < 0,05$), o que também resultou na diferença significativa ($t = 2,67$; $P < 0,05$) no tempo médio decorrido entre o tempo médio da menarca e da menopausa. Isto sugere que, as mulheres com dois genótipos considerados de risco têm uma maior exposição ao estrogênio endógeno dos que as com um genótipo considerado de risco e, portanto, uma maior probabilidade de desenvolver câncer mamário. No entanto, informações sobre esta comparação não são encontradas na literatura, o que aliada ao pequeno número de casos por nós estudados, resulta que a mesma não é consistente para uma interpretação mais segura, mas, não há dúvida que, devido a sua relevância, a mesma deve ser analisada em outros estudos.

A impossibilidade de análise do efeito dos três genótipos considerados de risco, devido a poucos indivíduos apresentarem esta combinação, não permitiu uma avaliação do efeito interativo dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* no desenvolvimento do câncer de mama.

Quando os genótipos considerados de risco foram analisados em relação ao tamanho do tumor não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as médias, sugerindo que os diferentes genótipos considerados de risco não influenciam no tamanho do tumor.

Na avaliação do grau dos carcinomas e do envolvimento de linfonodos regionais os testes de qui-quadrado não apresentaram resultados estatisticamente significativos, indicando que os diferentes graus histológicos (I, II e III) distribuem-se igualmente nos diferentes genótipos considerados de risco, o mesmo acontecendo com a presença ou ausência de linfonodos regionais.

Na comparação das frequências genóticas deste estudo com outras da literatura, as do *CYP1A1-MspI* (Tabela XVI) mostraram-se homoganeamente distribuídas tanto em pacientes como em controles. As frequências do presente estudo das pacientes e dos controles foram muito próximas das descritas por LI et al. (2004), numa amostra da população da Carolina do Norte nos Estados Unidos, que também não encontraram associação para o polimorfismo *CYP1A1-MspI* com o câncer de mama. Nossos resultados das frequências gênicas dos controles também foram próximos dos de GARTE et al. (2001). O resultado desta comparação é relevante por corroborar com maior ênfase a fidelidade dos nossos dados com os de GARTE et al. (2001) que trabalharam apenas com controles e com um grande número amostral (4453), objetivando obter com a maior precisão possível a frequência específica-populacional de diferentes polimorfismos. GARTE et al. (2001) salientam que, se em estudos com amostras de tamanho pequeno, as frequências alélicas forem significativamente diferentes das descritas por eles, deve-se considerar aumentar o tamanho da amostra ou procurar por erros metodológicos.

Já para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, a comparação das frequências obtidas com as de dados da literatura demonstrou que as mesmas não se apresentam homogeneamente distribuídas (Tabelas XVII e XVIII). A análise dos χ^2 parciais permite identificar, em alguns casos, as diferenças mais importantes entre os valores observados e os esperados e, portanto, as principais responsáveis pelas diferenças estatisticamente significantes. Assim, para o gene *GSTM1* (Tabela XVII), os dados das pacientes estudadas por MATHESON et al. (2002) (A) apresentaram um χ^2 parcial de 5,46 que representou 61% do valor do χ^2 total, que foi igual a 8,97. Para o gene *GSTT1* (Tabela XVIII), o χ^2 parcial da amostra de pacientes do trabalho de AMORIM et al. (2002) (B), apresentou um valor de 8,96, representando 58% do valor do χ^2 total (15,58) e nos controles, nos dados de MATHESON et al. (2002) (A) o χ^2 parcial de 19,11 representou 75% do χ^2 total que foi igual a 25,45.

Como se pode observar no desenvolvimento deste trabalho, os resultados sobre a associação dos genes estudados e o risco de desenvolvimento de câncer de mama são em geral controversos. Este fato pode ser devido tanto a fatores biológicos, como as diferentes distribuições gênicas em diferentes etnias, a desequilíbrios de ligação (PHAROAH et al., 2004), a exposição a fatores ambientais (DUNNING et al., 1999) e também devido a fatores metodológicos. Nesse aspecto, deve-se ressaltar a ocorrência de resultados falso-positivos (erro tipo I) ao acaso, ou também por falta de poder estatístico adequado, gerando resultados falso-negativos (erro tipo II). O pareamento étnico e etário observado entre pacientes e controles em alguns trabalhos nem sempre é eficiente e se constitui numa variante de importância que pode interferir nos resultados obtidos. No entanto, esse procedimento pode ser perfeitamente compatibilizado por um maior rigor metodológico.

O tamanho amostral é outra variável que deve ser considerada. A realização de estudos com amostras suficientemente grandes (com poder estatístico significativo) por um único grupo de pesquisa muitas vezes não é possível, devido a questões financeiras ou de tempo. Conseqüentemente, estudos com amostras

menores são de importância, pois, as informações obtidas por metodologias semelhantes podem ser analisadas em conjunto (meta-análise), podendo fornecer informações consistentes. Com isso, colaborações entre diferentes grupos de pesquisa poderiam possibilitar uma nova fase dos estudos de associação, com amostras maiores e com a identificação, ou confirmação, de genes de susceptibilidade ao câncer. Portanto, a melhor padronização das variáveis biológicas, ambientais e metodológicas pode fornecer informações mais consistentes sobre marcadores biológicos de relevância para o estudo de importantes patologias humanas e para o melhor conhecimento da dinâmica gênica nas populações humanas, o que é também relevante sobre o ponto de vista evolutivo.

Nossos resultados sugerem que, apesar dos genes estudados estarem sendo expressos no tecido mamário e também estarem envolvidos no biometabolismo do estrogênio, podem não contribuir de forma isolada para o risco de desenvolvimento do câncer de mama. No entanto, os mesmos podem ser relevantes numa atuação conjunta com outros genes na carcinogênese mamária humana.

7 CONCLUSÃO

- As frequências do alelo dominante do gene *CYP1A1-MspI* foram iguais a 0,86 e 0,89 e as do alelo recessivo foram iguais a 0,14 e 0,11, respectivamente nas pacientes e nos controles.
- Para o *GSTM1*, a frequência de pacientes com genótipos dominantes (+/+ e +/-) foi igual a 0,47 e de homozigotas recessivas (-/-) igual a 0,53. Nos controles, as respectivas frequências foram iguais a 0,45 e 0,55.
- Para o gene *GSTT1* observou-se as mesmas frequências nas pacientes e nos controles: 0,64 com genótipos dominantes (+/+ e +/-) e 0,36 homozigotas recessivas (-/-).
- Não foi demonstrada associação entre os genótipos considerados de risco *CYP1A1-MspI* +/- e -/-, *GSTM1*- e *GSTT1*-, analisados separadamente ou em conjunto, com o câncer de mama.
- Na análise dos parâmetros clínicos com genótipo *GSTT1*- detectou-se que o tempo médio de uso de pílulas anticoncepcionais foi maior nas pacientes do que nos controles, sendo a diferença estatisticamente significativa.
- A média da idade da menopausa das pacientes com dois genótipos considerados de risco foi significativamente maior do que as pacientes com um genótipo considerado de risco, o que também resultou na diferença significativa do tempo entre a menarca e a menopausa.
- As demais médias dos diferentes parâmetros clínicos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as pacientes e controles e entre as pacientes com diferentes combinações genotípicas consideradas de risco.
- Não se detectou diferenças estatisticamente significativas entre as médias do tamanho dos tumores e a distribuição dos diferentes graus

histológicos e da presença ou ausência de linfonodos regionais em pacientes com diferentes genótipos considerados de risco.

- Os valores absolutos dos nossos dados comparados com os da literatura apresentaram-se homogeneamente distribuídos, tanto nas pacientes como nos controles, para o gene *CYP1A1-MspI*. Para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, as mesmas comparações demonstraram que os dados obtidos não estavam igualmente distribuídos nas diferentes amostras populacionais consideradas.

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R. A.; ANWAR, W. A.; AU, W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.*, 107: 229-233, 1996.

ACEVEDO, C.; OPAZO, J. L.; HUIDOBRO, C.; CABEZAS, J.; ITURRIETA, J.; QUINONES SEPULVEDA, L. Positive correlation between single or combined genotypes of *CYP1A1* and *GSTM1* in relation to prostate cancer in Chilean people. *Prostate*, 57 (2): 111-117, 2003.

ADA, A. O.; SÜZEN, S. H.; ISCAN, M. Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 in a Turkish population. *Toxicol. Lett.*, 151 (1): 311-315, 2004.

AKTAS, D.; GUNAY, I.; ALIKASFOGLU, M.; YÜCE, K.; TUNCBILEK, E.; AYHAN, A. CYP1A1 Gene polymorphism and risk of epithelial ovarian neoplasm. *Gynecol. Oncol.*, 86: 124-128, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4 ed., New York: Garland Science, 2002.

ALI-OSMAN, F.; AKANDE, O.; ANTOUN, G.; MAO, J. X.; BUOLAMWINI, J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants: evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.*, 272: 10004-10012, 1997.

AMBROSONE, C. B.; COLES, B. F.; FREUDENHEIM, J. L.; SHIELDS, P. G. Glutathione S-transferase (GSTM1) genetic polymorphisms do not affect human breast cancer risk, regardless of dietary antioxidants. *J. Nutr.*, 129: 565s-568s, 1999.

AMORIM, L. M. F.; ROSSINI, A.; MENDONÇA, G.; LOTSCH, P.; DE ALMEIDA SIMÃO, T.; GALLO, C. V. M.; PINTO L. CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.*, 181 (2): 179-186, 2002.

AMORIM, L. M. F.; LOTSCH, P. F.; SIMÃO, T. A.; GALLO, C. V. M.; PINTO, L. F. R. Analysis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutat. Res.*, 547: 35-40, 2004.

ANTTILA, S.; HAKKOLA, J.; TUOMINEN, P.; ELOVAARA, E.; HUSGAFVELPURSIANEN, K.; KARJALAINEN, A.; HIRVONEN, A.; NURMINEN, T. Methylation of cytochrome P4501A1 promoter in the lung is associated with tobacco smoking. *Cancer Res.*, 63 (24): 8623-8628, 2003.

ANWAR, W. A.; ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R.; MOSTAFA, H. M.; AU, W. W.

Genetic polymorphism of *GSTM1*, *CYP2E1* and *CYP2D6* in Egyptian bladder cancer patients. **Carcinogenesis**, 17: 1923-1929, 1996.

ARRUDA, V. R.; GRIGNOLLI, C. E.; GONÇALVES, M. S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin. Genet.**, 54: 210-214, 1998.

ARVANITIS, D. A.; GOUMENOU, A. G.; MATALLIOTAKIS, I. M.; KOUMANTAKIS, E. E.; SPANDIDOS, D. A. Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. **Fertil. Steril.**, 76: 1202-1206, 2001.

AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat. Res.**, 464: 65-76, 2000.

BAILEY, L. R.; ROODI, N.; VERRIER, C. S.; YEE, C. J.; DUPONT, W. D.; PARL, F. F. Breast cancer and *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. **Cancer Res.**, 58: 65-70, 1998.

BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. **Mutat. Res.**, 462: 255-279, 2000.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos gens nas famílias e nas populações**. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 1994.

BISHOP, J. M. Viral Oncogenes. **Cell.**, 42: 23-38, 1985.

BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science**, 235: 305-311, 1987.

BOARD, P. G.; WEBB, G. C.; COGGAN, M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. **Ann. Hum. Genet.**, 53: 205-213, 1989.

BOARD, P.; COGGAN, M.; JOHNSTON, P.; ROSS, V.; SUZUKI, T.; WEBB, G. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. **Pharm. Therap.**, 48: 357-369, 1990.

CAPDEVILA, J.; HARRIS, R. C.; FALCK, J. R. Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. **Cell Mol. Life Sci.**, 59: 780-789, 2002.

CAPORASO, N.; PICKLE, L. W.; BALE, S.; AYESH, R.; HETZEL, M.; IDLE, J. The distribution of debrisoquine metabolic phenotypes and implications for the suggested association with lung cancer risk. **Genet. Epidemiol.**, 6: 517-524, 1989.

CAPORASO, N. E.; TUCKER, M. A.; HOOVER, R. N.; HAYES, R. B.; PICKLE, L. W.; ISSAW, H. J.; MUSCHIK, G. M.; GREEN-GALLO, L.; BUIVYS, D.; AISNER, S.;

RESAU, J. H.; TRUMP, B. F.; TOLLERUD, D.; WESTON, A.; HARRIS, C. C. Lung cancer and the debrisoquine metabolic phenotype. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82: 1264-1272, 1990.

CAPORASO, N. Selection of candidate genes for population studies. Em: **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. IARC Scientific publications. Lyons, 148: 23-36, 1999.

CARSTENSEN, U.; ALEXANDRIE, A. K.; HÖGSTEDT, B.; RANNUG, A. BRATT, I.; HAGMAR, L. B- and T- lymphocyte micronuclei in chimney sweeps with respect to genetic polymorphism for *CYP1A1* and *GST1* (class Mu). **Mut. Res.**, 289: 187-195, 1993.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exptl. Cell Res.**, 60: 315-319, 1970a.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. *et al.* Identification of human chromosome by DNA-binding fluorescent agent. **Chromosoma**, 60: 215-227, 1970b.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Quinacrine mustard-fluorescence of human chromosomes 4, 5 and X. **Exptl. Cell Res.**, 61: 474-476, 1970c.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. **Exptl. Cell Res.**, 62: 480-492, 1970d.

CAVALIERI, E. L.; STACK, D. E.; DEBANESAN, P. D.; TODOROVIC, R.; DWIVEDY, L.; HIGGINBOTHAM, S.; JOHANSSON, S. L.; PATIL, K. D.; GROSS, M. L.; GOODEN, J. K.; RAMANATHAN, R.; CERNY, R. L.; ROGAN, E. G. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 10937-10942, 1997.

CHARRIER, J.; MAUGARD, C. M.; Le MEVEL, B.; BIGNON, Y. J. Allelotype influence at glutathione S-transferase *M1* locus on breast cancer susceptibility. **Br. J. Cancer**, 79: 346-353, 1999.

CHEVALIER, D.; ALLORGE, D.; LO-GUIDICE, J. M.; CAUFFIEZ, C.; LHERMITTE, M.; LAFITTE, J. J.; BROLY, F. Detection of known and two novel (M331I and R464S) missense mutations in the human *CYP1A1* gene in a French Caucasian population. **Hum. Mutat.**, 17: 355, 2001.

CHIOCCA, E. A.; WAXMAN, D. J. Cytochrome p450-based gene therapies for cancer. **Methods Mol. Med.**, 90: 203-222, 2004.

COMMANDEUR, J. N.; STIJNTJES, G. J.; VERMEULEN, N. P. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacol. Rev.**, 47: 271-330, 1995.

COOPER, G. M. Elements of human cancer. Boston: **Jones and Bartlett Publishers**, 1994.

COLDITZ, G. A. Epidemiology of breast cancer: findings from the nurses' health study. **Cancer Suppl.**, 15: 1480-1489, 1993.

COLLINS, J. A.; BLAKE, J. M.; CROSIGNANI, P. G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Human Reprod. Update**, 11 (6): 545-560, 2005.

COTTON, S. C.; SHARP, L.; LITTLE, J.; BROCKTON, N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a huge review. **Am. J. Epidemiol.**, 151 (1): 7-32, 2000.

CROFTS, F.; COSMA, G. N.; CURRIE, D.; TAIOLI, E.; TONIOLO, P.; GARTE, S. J. A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. **Carcinogenesis**, 14: 2652, 1993.

DAWLING, S.; HACHEY, D. L.; ROODI, N.; PARL, F. F. In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. **Chem. Res. Toxicol.**, 17: 1258-1264, 2004.

De JONG, J. L.; MOHANDAS, T.; TU, C.P. D. The human H(b) (mu) class glutathione S-transferases are encoded by a dispersed gene family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 180: 15-22, 1991.

DIALYNA, I. A.; MIYAKIS, S.; GEORGATON, N.; SPANDIDOS, D. A. Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes and lung cancer risk. **Oncol. Rep.**, 10 (6): 1829-1835, 2003.

DeVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. Cancer: Principles & Practice of Oncology. 5 ed. Philadelphia, **J. B. Lippincott-Raven Publishers**, 1997.

DUNNING, A. M.; HEALEY, C. S.; PHAROAH, P. D. P.; TEARE, M. D.; PONDER, B. A. J.; EASTON, D. F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 8: 843-854, 1999.

EGAN, K. M., CAI, Q.; SHU, X.; JIN, F.; ZHU, T.; DAI, Q.; GAO, Y.; ZHENG, W. Genetic polymorphisms in *GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1* and the risk for breast cancer: results from the Shanghai breast cancer study and meta-analysis. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 13: 197-204, 2004.

EL-ZEIN, R.; ZWISCHENBERGER, J. B.; WOOD, T. G.; ABDEL-RAHMAN, S. Z.; BREKELBAUM, C.; AU, W. W. Combined genetic polymorphism and risk for development of lung cancer. **Mutat. Res.**, 381 (2): 189-200, 1997.

ENGEL, L. S.; TAIOLI, E.; PFEIFFER, R.; GARCIA-CLOSAS, M.; MARCUS, P. M.; LAN, Q.; BOFFETTA, P.; VINEIS, P.; AUTRUP, H.; BELL, D. A.; BRANCH, R. A.; BROCKMOLLER, J.; DALY, A. K.; HECKBERT, S. R.; KALINA, I.; KANG, D.; KATO, T.; LAFUENTE, A.; LIN, H. J.; ROMKES, M.; TAYLOR, J. A.; ROTHMAN, N. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, 156 (2): 95-109, 2002.

EUBANKS, M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. **Environ. Health Perspect.**, 102: 50-56, 1994.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.**, 61: 759-767, 1990.

FEIGELSON, H. S.; ROSS, R. K.; YU, M. C.; COETZEE, G. A.; REICHARDT, J. K.; HENDERSON, B. E. Genetic susceptibility to cancer from exogenous and endogenous exposures. **J. Cell Biochem. Suppl.**, 25: 15-22, 1996.

FONTANA, X.; PEYROTTE, I.; ROSSI, C.; LEBLANC-TALENT, P.; ETTORE, F.; NAMER, M.; BUSSIÈRE, F. Study of frequencies of *CYP1A1* gene polymorphisms and glutathione S-transferase *mu1* gene in primary breast cancers: an update with an additional 114 cases. **Mutat. Res.**, 403: 45-53, 1998.

GARCIA-CLOSAS, M.; KELSEY, K. T.; HANKINSON, S. E.; SPIEGELMAN, D.; SPRINGER, K.; WILLETT, W. C.; SPEIZER, F. E.; HUNTER, D. J. Glutathione S-transferase μ and θ polymorphisms and breast cancer susceptibility. **J. Natl. Cancer Inst.** (Bethesda), 91: 1960-1964, 1999.

GARTE, S. J.; TRACHMAN, F.; CROFTS, F.; TONIOLO, P.; BUXBAUM, J.; BAYO, S.; TAIOLI, E. Distribution of composite CYP1A1 genotypes in Africans, African-Americans and Caucasians. **Human Hered.**, 46: 121-127, 1996.

GARTE, S. J. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. **Carcinogenesis**, 19: 1329-1332, 1998.

GARTE, S.; GASPARI, L.; ALEXANDRIE, A. K.; AMBROSONE, C.; AUTRUP, H.; AUTRUP, J. L.; BARANOVA, H.; BATHUM, L.; BENHAMOU, S.; BOFFETTA, P.; BOUCHARDY, C.; BRESKVAR, K.; BROCKMOLLER, J.; CASCORBI, I.; CLAPPER, M. L.; COUTELLE, C.; DALY, A.; DELL'OMO, M.; DOLZAN, V.; DRESLER, C. M.; FRYER, A.; HAUGEN, A.; HEIN, D. W.; HILDESHEIM, A.; HIRVONEN, A.; HSIEH, L. L.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; KALINA, I.; KANG, D.; KIHARA, M.; KIYOHARA, C.; KREMERS, P.; LAZARUS, P.; LE MARCHAND, L.; LECHNER, M. C.; VAN LIESHOUT, E. M.; LONDON, S.; MANNI, J. J.; MAUGARD, C. M.; MORITA, S.; NAZAR-STEWART, V.; NODA, K.; ODA, Y.; PARL, F. F.; PASTORELLI, R.; PERSSON, I.; PETERS, W. H.; 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.; STUCKER, I.; SUGIMURA, H.; TO-FIGUERAS, J.; VINEIS, P.; YU, M. C.; TAIOLI, E. Metabolic gene

polymorphism frequencies in control populations. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 10: 1239-1248, 2001.

GATTÁS, G. J. F.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup. Med.**, 50 (7): 508-511, 2000.

GATTÁS, G. J. F.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J. A.; SIRAQUE, M. S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M. A. V.; BYDLOWSKI, S. P. Ethnicity and glutathione S-transferase (*GSTM1/GSTT1*) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37: 451-458, 2004.

GEISLER, S. A.; OLSHAN, A. F. *GSTM1*, *GSTT1* and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Am. J. Epidemiol.**, 154: 95-105, 2001.

GILLILAND, F. D. Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? **Environ. Health Perspect.**, 105: 897-900, 1997.

GORDON, H. Oncogenes. **Mayo Clin. Proc.**, 60: 697-713, 1985.

GOTO, I.; YONEDA, S.; YAMAMOYO, M.; KAWAJIRI, K. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the *CYP1A1* and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. **Cancer Res.**, 56: 3725-3730, 1996.

GOUGH, A. C.; SMITH, C. A. D.; HOWELL, S. M.; WOLF, C. R.; BRYANT, S. P.; SPURR, N. K. Localization of the *CYP2D* gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. **Genomics**, 15: 430-432, 1993.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. Telomeres, telomerase and cancer. **Sci. Am.**, 274: 80-85, 1995.

GUENGUERICH, F. P. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, 21: 345-351, 2000.

HAN, W.; KANG, D.; PARK, I. A.; KIM, S. W.; BAE, J. Y.; CHUNG, K.; NOH, D. Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. **Clinical Cancer Res.**, 10: 124-130, 2004.

HARRIES, L. W.; STUBBINS, M. J.; FORMAN, D.; HOWARD, G. C.; WOLF, C. R. Identification of genetic polymorphisms at glutathione S-transferases Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. **Carcinogenesis**, 18: 641-644, 1997.

HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 18: 357-377, 2002.

HELZLSouer, K. J.; SELMIN, O.; HUANG, H. Y.; STRICKLAND, P. T.; HOFFMAN,

S.; WATSON, A. J.; COMSTOCK, G. W.; BELL, D. J. Association between glutathione S-transferases *M1*, *P1*, and *T1* genetic polymorphisms and development of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, 90: 512-518, 1998.

HILDEBRAND, C. E.; GONZALEZ, F. J.; MCBRIDE, O. W.; NEBERT, D. W. Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 gene to chromosome 15. **Nucleic Acids Res.**, 13: 2009-2016, 1985.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411: 366-374, 2001.

HUNG, H. C.; CHUANG, J.; CHIEN, Y. C.; CHERN, H. D.; CHIANG, C. P.; KUO, Y. S.; HILDESHEIM, A.; CHEN, C. J. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; environmental factors and risk of oral cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 6 (11): 901-905, 1997.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Res.**, 58: 4023-4037, 1998.

IDLE, J. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? **Mutat. Res.**, 247: 259-266, 1991.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: Janeiro de 2006.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R. A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends Pharmacol Sci.**, 20: 342-349, 1999.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. **Mutat. Res.**, 482: 11-19, 2001.

INNES, K. E.; BYERS, T. E. Smoking during pregnancy and breast cancer risk in very young women (United States). **Cancer Causes Control**, 12: 179-185, 2001.

ISHIBE, N.; HANKINSON, S. E.; COLDITZ, G. A.; SPIEGELMAN, D.; WILLET, W. C.; SPEIZER, F. E.; KELSEY, K. T.; HUNTER, D. J. Cigarette smoking, cytochrome P450 1A1 polymorphisms, and breast cancer risk in the Nurse's Health Study. **Cancer Res.**, 58: 667-671, 1998.

KATO, S.; SHIELDS, G.; CAPORASO, N.; SUGIMURA, H.; TRIVERS, G. E.; TUCKER, M. A.; TRUMP, B. F.; WESTON, A.; HARRIS, C. C. Analysis of cytochrome p450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 3: 515-518, 1997.

KAWAJIRI, K. CYP1A1. **IARC Sci. Publ.**, 148: 159-172, 1999.

KAWAJIRI, K.; NAKACHI, K.; IMAI, K.; YAOSHII, A.; SHINODA, N.; WATANABE, J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P-450IA1 gene. **FEBS Lett.**, 263: 131-133, 1990.

KAWAJIRI, K.; WATANABE, J.; GOTOH, O.; TAGASHIRA, Y.; SOGAWA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. **Europ. J. Biochem.**, 159: 219-225, 1996.

KELLEY, M. K.; ENQVIST-GOLDSTEIN, A.; MONTALI, J.; WHEATLEY, J. B.; SCHMIDT Jr., D. E.; KAUAR, L. M. Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer breast human tissue. **Bioch. J.**, 304: 843-848, 1994.

KOLBLE, K. Regional mapping of short tandem repeats on human chromosome 10: cytochrome P450 gene CYP2E, D10S196, D10S220, and D10S225. **Genomics**, 18: 702-704, 1993.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review. **Mutat. Res.**, 463: 247-283, 2000.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, 396: 643-649, 1998.

LI, Y.; MILLIKAN, R. C.; BELL, D. A.; CUI, L.; TSE, C. J.; NEWMAN, B.; CONWAY, K. Cigarette smoking, cytochrome p450IA1 polymorphisms, and breast cancer among African-American and white women. **Breast Cancer Res.**, 6: 460-473, 2004.

LIEHR, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? **Endocr. Rev.**, 21: 40-54, 2000.

LIEHR, J. G.; ROY, D. Free radical generation by redox cycling of estrogens. **Free Radical Biol. Med.**, 8: 415-423, 1990.

LIN, D. X.; TANG, Y. M.; PENG, Q.; LU, S. X.; AMBROSONE, C. B.; KADLUBAR, F. F. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione S-transferases T1, P1, and M1 and cytochrome P450 2E1. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 11: 1013-1018, 1998.

LIZARD-NACOL, S.; COUDERT, B.; COLOSETTI, P.; RIEDINGER, J.; FARGEOT, P.; BRUNET-LECOMTE, P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. **Breast Cancer Res.**, 1 (1): 81-87, 1999.

LOURO, I. D.; LLERENA JR., J. C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. Genética molecular do câncer. 2 ed., São Paulo, **MSG Produção Editorial**, 2002.

MANJER, J.; MALINA, J.; BERGLUND, G.; BONDESON, L.; GARNE, J. P.; JANZON, L. Increased incidence of small and well-differentiated breast tumours in post-menopausal women following hormone-replacement therapy. **Int. J. Cancer**, 92: 919-922, 2001.

MANNERVIK, B.; ALIN, P.; GUTHENBERG, C.; JENSSON, H.; TAHIR, M. K.; WARHOLM, M.; JORNVALL, H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82 (21): 7202-7206, 1985.

MATHESON, M. C.; STEVENSON, T.; AKBARZADEH, S.; PROPERT, D. N. *GSTT1* null genotype increases risk of premenopausal breast cancer. **Cancer Lett.**, 181: 73-79, 2002.

MENDONÇA, F. F.; URATA, Y. N.; BUOSI, T. B.; KOWALSKI, L. P.; RAINHO, C. A.; ROGATTO, S. R. Genotipagem dos genes *CYP1A1*, *CYP1A2*, *GSTM1* e *GSTT1* em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Resumos do 49º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, **SBG**, 2003. 1 CD-ROM.

MILLER, M. P. RXC: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University. **Flagstaff**, 1997

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. **Nucl. Acid. Res.**, 16: 1215, 1988.

MILLIKAN, R.; PITTMAN, G.; TSE, C.; SAVITZ, D. A.; NEWMAN, B.; BELL, D. Glutathione S-transferases *M1*, *T1*, and *P1* and breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 9: 567-573, 2000.

MITELMAN, F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. **Mutation Research**, 462: 247-253, 2000.

MITRUENEN, K. Glutathione S-transferase *M1*, *M3*, *P1*, and *T1* genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 10: 229-236, 2001.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mut. Res.**, 544 (1): 9-41, 2003.

MOSCOW, J. A.; TOWNSEND, A. J.; GOLDSMITH, M. E.; WHANG-PENG, J.; VICKERS, P. J.; POISSON, R.; LEGAULT-POISSON, S.; MYERS, C. E.; COWAN, K. H. Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 85: 6518-6522, 1988.

MIYOSHI, Y.; NOGUCHI, S. Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing

genes and breast cancer risk in Japanese women. **Biomed. Pharmacother**, 57 (10): 471-481, 2003.

MIYOSHI, Y.; ANDO, A.; HASEGAWA, S.; ISHITOBI, M.; YAMAMURA, J.; IRAHARA, N.; TANJI, Y.; TAGUCHI, T.; TAMAKI, Y.; NOGUCHI, S. Association of genetic polymorphisms in *CYP10* and *CYP1A1* with the oestrogen receptor-positive breast cancer risk. **Eur. J. Cancer**, 39 (17): 2531-2537, 2003.

NAIR, U.; BARTSCH, H. Metabolic polymorphisms as susceptibility markers for lung and oral cavity cancer. **IARC Sci. Publ.**, 154: 271-290, 2001.

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 Res.**, 51: 5177-5180, 1991.

NAKATA, L. C.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; SANTOS, I. Biomarkers of susceptibility to endometriosis. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, 26 (4): 299-304, 2004.

NEBERT, D. W.; ADESNIK, M.; COON, M. J., ESTABROOK, R. W.; GONZALEZ, F. J.; GUENGERICH, F. P.; GUNSALUS, I. C.; JOHNSON, E. F.; KEMPER, B.; LEVIN, W.; PHILLIPS, I. R.; SATO, R.; WATERMAN, M. R. The P450 superfamily: recommended nomenclature. **DNA**, 6: 1-11, 1987.

NEBERT, D. W. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. **Mutat. Res.**, 247: 267-281, 1991.

NEBERT, D. W.; MCKINNON, R. A.; PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA Cell Biol.**, 15: 273-280, 1996.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, 132: 1497, 1960.

OKOBIA, M.; BUNKER, C.; ZMUDA, J.; KAMMERER, C.; VOGEL, V.; UCHE, E.; ANYANWU, S.; EZEOME, E.; FERRELL, R.; KULLER, L. Cytochrome P4501A1 genetic polymorphisms and breast cancer risk in Nigerian women. **Breast Cancer Res. Treat.**, 94: 285-293, 2005.

ORELLANA, B.; GUAJARDO, V. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. **Rev. Med. Chile**, 132: 85-94, 2004.

OMS: Organização Mundial da Saúde. Disponível em <<http://www.who.org>> Acesso em: Set. 2004 e Jul. 2005.

PANDIS, N.; JIN, Y.; GORUNOVA, L.; PETERSSON, C.; BARDI, G.; IDVALL, I.; JOHANSSON, B.; INGVAR, C. MANDAHN, N.; MITELMAN, F.; HEIM, S. Chromosome analysis of 97 breast carcinomas. Identification of eight karyotypic subgroups. **Genes, Chrom. Cancer**, 12: 173-185, 1995.

PARK, S. K.; YOO, K. Y.; LEE S. J.; KIM, S. U.; AHN, S. H.; NOH, D. Y.; CHOE, K. J.; STRICKLAND, P. T.; HIRVONEN, A.; KANG, D. Alcohol consumption, glutathione S-transferase *M1* and *T1* genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Pharmacogenetics**, 10: 301-309, 2000.

PARK, S. K.; KANG, D.; NOH, D. Y.; LEE, K. M.; KIM, S. U.; CHOI, J. Y.; CHOI, I. M.; AHN, S. H.; CHOE, K. J.; HIRVONEN, A.; STRICKLAND, P. T.; YOO, K. Y. Reproductive factors, glutathione S-transferase *M1* and *T1* genetic polymorphism and breast cancer risk. **Breast Cancer Res. Treat.**, 78: 89-96, 2003.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur. J. Cancer**, 37: 4-66, 2001.

PEMBLE, S.; SCHROEDER, K. R.; SPENCER, S. R.; MEYER, D. J.; HALLIER, E.; BOLT, H. M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J. B. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochem. J.**, 300: 271-276, 1994.

PERERA, F. P. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. **J. Natl. Cancer Inst.**, 88: 496-509, 1996.

PERERA, F. P. Environment and cancer: who are susceptible? **Science**, 278: 1068-1073, 1997.

PERERA, F. P.; ESTABROOK, A.; HEWER, A.; CHANNING, K.; RUNDLE, A.; MOONEY, L. A.; WHYATT, R.; PHILLIPS, D. H. Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 4: 233-238, 1995.

PERSSON, I.; JOHANSSON, I.; BERGLING, H.; DAHL, M. L.; SEIDEGARD, J.; RYLANDER, R.; RANNUG, A.; HOGBERG, J.; SUNDBERG, M. I. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. **FEBS Lett.**, 319 (3): 207-211, 1993.

PERSSON, I.; JOHANSSON, I.; BERGLING, H.; MARJA-LIISA, D.; SEIDEGAD, J. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1: regulation and toxicological significance. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 7: 25-36, 1995.

PHAROAH, P. D. P.; DUNNING, A. M.; PONDER, P. A. J.; EASTON, D. F. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. **Nat. Rev. Cancer**, 4: 850-860, 2004.

PICKETT, C. B.; LU, A. Y. H. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. **Ann. Rev. Bioch.**, 58: 743-764, 1989.

REBBECK, T. R. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol., Biom. and Prevent.**, 6: 733-743, 1997.

RIBEIRO, L. R. (Org); SALVADORI, D. M. F. (Org); MARQUES, E. K. (Org). Mutagênese Ambiental. Canoas, **Editora da ULBRA**, 2003.

RODDAM, P. L.; ROLLINSON, S.; KANE, E.; ROMAN, E.; MOORMAN, A.; CARTWRIGHT, R.; MORGAN, G. J. Poor metabolizers at the cytochrome P450 2D6 and 2C19 loci are at increased risk of developing adult acute leukaemia. **Pharmacogenetics**, 7: 605-615, 2000.

ROODI, N.; DUPONT, W. D.; MOORE, J. H.; PARL, F. F. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. **Cancer Res.**, 64: 1233-1236, 2004.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C. M.; AMORIM, L. M. F.; MACEDO, J. M. B.; MEDINA, R.; NETO.; GALLO, C. V. M.; PINTO, L. F. R. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genet. and Mol. Res.**, 1 (3): 233-240, 2002.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, 20: 3156-3165, 2001.

RYBERG, D.; SKAUG, V.; HEWER, A.; PHILLIPS, D. H.; HARRIES, L. W.; WOLF, C. R.; OGREID, D.; ULVIC, A.; VU, P.; HAUGEN, A. Genotypes of glutathione S-transferase M1 e P1 and significance for lung DNA adducts levels and cancer risk. **Carcinogenesis**, 60: 284-295, 1997.

SACHSE, C.; BROCKMOLLER, J.; BAUER, S.; ROOTS, I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. **Am. J. Hum. Genet.**, 60: 284-295, 1997.

SAITO, T.; EGASHIRA, M.; KIYOTANI, K.; FUJIEDA, M.; YAMAZAKI, H.; KIYOHARA, C.; KUNITOH, H.; KAMATAKI, T. Novel Nonsynonymous Polymorphisms of the CYP1A1 Gene in Japanese. **Drug Metab. Pharmacokinet.**, 18: 218-221, 2003.

SEIDEGARD, J.; PERO, R. W.; MARKOWITZ, M. M.; ROUSH, G.; MILLER, D. G.; BEATTIE, E. J. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. **Carcinogenesis**, 11: 33-36, 1990.

SEIDEGARD, J.; PERO, R. W.; MILLER, D. G.; BEATTIE, E. J. A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. **Carcinogenesis**, 7: 751-753, 1986.

SHI, C. Y.; SEOW, A.; LIN, Y.; CHIA, K. S.; ONG, C. N.; CHAN, S. H.; LEE, H. P. Biomarkers: a molecular approach to cancer epidemiology. **Ann. Acad. Med. Singapore**, 25: 49-54, 1996.

SHIMADA, T.; FUJII-KURIYAMA, Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic

hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. **Cancer Sci.**, 95 (1): 1-6, 2004.

SMART, J.; DALY, A. K. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. **Pharmacogenetics**, 10: 11-24, 2000.

SUNDBERG, K.; JOHANSSON, A. S.; STENBERG, G.; WIDERSTEN, M.; SEIDEL, A.; MANNERVIK, B.; JERNSTROM, B. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Carcinogenesis**, 19: 433-436, 1998.

TAIOLI, E.; TRACHMAN, J.; CHEN, X.; TONIOLO, P.; GARTE, S. J. A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. **Cancer Res.**, 55: 3757-3758, 1995.

TAIOLI, E.; BRADLOW, H. L.; GARBERS, S. V.; SEPKOVIC, D. W.; OSBORNE, M. P.; BEATTIE, E. J. Isoenzymes of glutathione transferase (class μ) as a marker for susceptibility to lung cancer: a follow-up study. **Carcinogenesis**, 11: 33-36, 1999.

TERRY, P.; MILLER, A.; ROHAN, T. Cigarette smoking and breast cancer risk: a long latency period? **Int. J. Cancer**, 100: 723-728, 2002.

THIER, R.; BRUNING, T.; ROOS, P. H.; RIBS, H. P.; GOLKA, K.; KO, Y.; BOLT, H. M. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. **Int. J. Environ. Health**, 206 (3): 149-171, 2003.

THOMPSON, A., AMBROZONE, C. Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in oestrogen metabolism enzymes in human breast cancer. **J. Nat. Cancer Inst. Monographs.**, 27: 125-134, 2000.

VAN DER HEL, O. L.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; VAN GILS, C. H.; ROEST, M.; SLOTHOUBER, B.; GROBBEE, D. E.; PEETERS, P. H. M. Cumulative genetic defects in carcinogen metabolism may increase breast cancer risk (The Netherlands). **Cancer Causes Control**, 16: 675-681, 2005.

VAURY, C.; LAINE, R.; NOGUIEZ, P.; DE COPPET, P.; JAULIN, C.; PRAZ, F.; POMPON, D.; AMOR-GUÉRET, M. Human glutathione S-transferase CYP1A1*2A null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. **Cancer Res.**, 55: 5520-5523, 1995.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **TIG.**, 9: 138-141, 1993.

WATSON, M. A.; STEWART, R. K.; SMITH, G. B.; MASSEY, T. E.; BELL, D. A. Human glutathione S-transferases polymorphisms: Relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. **Carcinogenesis**, 19: 275-280, 1998.

WEINBERG, R. A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**, 230: 770-776, 1985.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254: 1138-1145, 1991.

WEINBERG, R. A. The integrations of molecular genetics into cancer management. **Cancer**, 70: 1653-1658, 1992.

WOGAN, G. N. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. **Environ. Health Perspect.**, 98: 167-178, 1992.

WORRALL, S.; CORRIGAN, M.; HIGH, A. Susceptibility and outcome in oral cancer; preliminary data showing an association with polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6. **Pharmacogenetics**, 5: 433-439, 1998.

XU, X.; KELSEY, K. T.; WIENCKE, J. K.; WAIN, J. C.; CHRISTIANI, D. C. Cytochrome P450 *CYP1A1* MspI polymorphism and lung cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 5: 687-692, 1996.

XU, S. J.; WANG, Y. P.; ROE, B.; PEARSON, W. R. Characterization of the human class μ glutathione S-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. **J. Biol. Chem.**, 273: 3517-3527, 1998.

YAGER, J. D. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. **J. Nat. Cancer Inst. Monographs**, 27: 67-73, 2000.

YE, J.; SHAN, B. E. Research on breast cancer susceptibility genes. **Ai Zheng.**, 21 (9): 1035-1039, 2002.

ZECH, L. Investigation at metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. **Exptl. Cell Res.**, 58: 463, 1969.

ZHONG, S.; WYLLIE, A. H.; BARNES, D.; WOLF, C. R.; SPURR, N. K. Relationship between the *GSTM1* genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. **Carcinogenesis**, 14: 1821-1824, 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE I – INFORMAÇÕES AO DOADOR

Linha de pesquisa: Estudos citogenéticos e moleculares em neoplasias humanas.

Projeto de pesquisa: “Análise molecular de genes do biometabolismo em tumores de mama”

1. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este estudo tem como principal objetivo estudar algumas características genéticas encontradas em tumores de mama. Esta pesquisa é muito importante, pois acreditamos que haja uma correlação entre estas características genéticas que desejamos estudar e o desenvolvimento das lesões (malignas ou benignas).

O que se chama de “características genéticas”, compreendem basicamente o estudo de genes que metabolizam hormônios produzidos pelo próprio organismo ou agentes tóxicos das células que normalmente podem estar presentes em locais de trabalho, como defensivos agrícolas, raios-X, metais pesados, etc.

2. Procedimentos a serem utilizados:

Serão recrutados cerca de 100 pacientes portadores de tumores de mama, os quais serão submetidos aos seguintes procedimentos:

- a) Os doadores responderão a um questionário padrão referente ao seu grupo étnico, estilo de vida, idade, local de nascimento, hábito tabagista, história familiar de câncer etc... Nesta etapa eles poderão fazer todas as perguntas que acharem necessárias para um perfeito esclarecimento de todas as suas dúvidas.
- b) Um profissional da área de saúde, devidamente treinado, colherá de cada voluntário cerca de 10 ml de sangue (punção venosa) com seringa plástica descartável, bem como uma amostra do tecido tumoral no ato cirúrgico.
- c) O sangue e o tecido tumoral serão levados ao Laboratório de Citogenética da UFPR e serão devidamente processados para extração do DNA e análise genética molecular.
- d) Os resultados serão analisados e correlacionados com hábito de vida, idade, história familiar de câncer e outros fatores da vida de cada doador.
- e) O término deste estudo está previsto para aproximadamente 48 meses.

3. Desconforto e Riscos:

Durante a colheita do sangue e do tecido lesionado o doador poderá sentir desconfortos, ou uma ligeira dor decorrente da picada da agulha no braço, ou ainda, dependendo do estado emocional da pessoa, sentir pânico ao ver seu próprio sangue ou mesmo uma fobia

pela agulha da seringa. Às vezes, podem ocorrer sentimentos de desconfiança por parte do doador em relação ao profissional que está retirando o sangue. Quanto aos riscos de se doar sangue, estes são desprezíveis, pois todo o material utilizado será descartável, eliminando qualquer possibilidade de contaminação por esta via.

4. Benefícios esperados:

Os benefícios com relação a este estudo se constituirão em informar ao médico oncologista responsável os resultados obtidos nesta pesquisa e suas implicações ao paciente. O médico, por sua vez, ficará encarregado de passar as informações pertinentes ao paciente. Além disso, os dados obtidos nesta pesquisa poderão ser divulgados em eventos e periódicos que poderão contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos com tais lesões.

5. Informações adicionais a respeito deste estudo:

O sangue periférico e o tecido serão coletados com seringas e agulhas estéreis e descartáveis e serão processados nas dependências da UFPR, em ambiente esterilizado e por profissionais especializados. No entanto, existem diferenças entre as células dos indivíduos em responder aos procedimentos técnicos utilizados e, portanto, em alguns casos, há a necessidade de se repetir a colheita do material. Caso isto aconteça, o doador poderá ser contactado para uma nova doação de sangue.

6. Confiabilidade do estudo:

Os doadores em hipótese alguma terão sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do estudo. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade do doador.

7. Acesso às informações obtidas:

Os pesquisadores e a Comissão de Ética que aprovaram este estudo, comprometem-se a fornecer aos doadores todas as informações que venham a ser obtidas durante a pesquisa.

APÊNDICE II - TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome do estudo: “Análise molecular de genes do biometabolismo em tumores de mama”

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

Código nº _____

HISTÓRIA PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: _____
- 2- Sexo: () M () F; Peso atual (kg): _____ ; Altura: _____
- 3- A qual grande grupo étnico você pertence ?
 Negróide () Caucasoíde () Asiático () Indígena () Outros ()
- 4- Idade: _____
- 5- Local de nascimento: Paraná ? () sim () não
 Se não: Que região brasileira ? Norte () Sul () Nordeste () Centro-Oeste ()
 Sudeste ()
- 6- Qual o seu grau de instrução?
 () analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
 () 2º grau completo () técnico () profissional () superior

Histórico de moradia

- 7- Qual era o tipo de construção onde você morou mais tempo?
 () alvenaria () madeira () barro () mista
- 8- Que tipo de cobertura tinha essa moradia? () telha barro comum () laje
 () folha de zinco () brasilite-eternit () sapé () outro (qual?) _____

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

- 9- Qual a atividade profissional que exerceu ou exerce? Há quanto tempo?
- 10- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?
 Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi: _____
- | | | |
|---|---------|---------|
| Derivados de petróleo
(querosene, gasolina, solventes,...) | () sim | () não |
| Tintas/ corantes | () sim | () não |
| Indústrias têxteis ou tecelagem | () sim | () não |
| Praguicidas / Herbicidas | () sim | () não |
| Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...) | () sim | () não |
| Processamento de madeira | () sim | () não |
| Papel ou celulose | () sim | () não |
| Mineração | () sim | () não |
| Fábrica de sapatos ou curtume | () sim | () não |
| Metalúrgica | () sim | () não |
| Usina de açúcar ou álcool | () sim | () não |
| Plástico ou borracha | () sim | () não |
| Outras substâncias químicas: | () sim | () não |

- 11- Se SIM para a pergunta acima: Você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas? (máscaras, luvas, óculos,...)
- a) () sim b) () não

Histórico Tabagista

- 12- Você fuma atualmente? () sim () não
- 13- Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?
 a) () 0-5 anos b) () 5-10 anos c) () >10
- 14- Quanto você fuma/fumava por dia ? () menos de ½ maço
 () de meio a 1 maço
 () mais de um maço
- (quantos: _____)
- 15- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?
 a) () sim b) () não

Histórico de Etilismo

- 16- Você consome/consumiu bebidas alcóolicas com frequência? () sim () não
- 17- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?
 a) () 0-5 anos. b) () 5 –10 anos. c) () mais 10 anos.
- 18- Que tipo de bebida alcóolica você costuma/ costumava consumir ?
 a) () Destiladas b) () Não-Destilada c) () Outra
- 19- Quanto você costuma/ costumava beber por semana?
 () no máximo um copo () de 2 a 5 copos () de 6 a 10 () de 11 a 30 () mais de 30
- 20- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?
 a) () Sim b) () Não

Histórico de Saúde

- 21- Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas? () sim () não () não me lembro
- 22- Você se submeteu a algum Raio-X?
 () sim () não
- 23- Se SIM, quantos? a) () Menos de 10 b) () Mais de 10
- Local: _____
- 24- Você tem ou já teve as seguintes doenças?
 () Pressão alta () Diabetes () Tuberculose () Câncer
 (localização do tumor _____)
- 25- Em casos de câncer na família, qual era o parentesco?
 () Pai () Mãe () Irmão () Filho () Tio () Primo () Outro
- 26- Qual era a localização do tumor?
 () Boca/garganta () Pulmão () Estômago () Intestino () Ginecológico () Mama
 () Outro (qual?) _____
- 27- Você já teve alguma moléstia venérea?
 a) () sim Qual? _____ b) () não

Histórico hormonal e reprodutivo

- 28- Idade da primeira menstruação (menarca): _____
- 29- Idade da última menstruação (menopausa): _____
- 30- Sua menstruação é/era : () regular () irregular
- 31- Teve abortos espontâneos? () sim Quantos: _____ () não

32- Teve filhos? () sim Quantos: _____ () não

33- Qual sua idade quando engravidou pela primeira vez? _____

34- Usou ou usa pílulas anticoncepcionais?

() sim Por quanto tempo: _____ () não

Marcadores Tumorais

ERBB2: _____

TP53: _____

REP: _____

Incluir informações das amostras do tumor (localização, laudo histo-patológico):
