

**SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA**



**ANÁLISE DOS GENES CYP1A1, CYP2D6 E GSTP1 EM PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Genética, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

**CURITIBA**

**2006**

**SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DOS GENES *CYP1A1*, *CYP2D6* E *GSTP1* EM PORTADORAS DE CÂNCER  
DE MAMA ESPORÁDICO**

**Monografia apresentada à disciplina de  
Estágio em Genética, como requisito para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas, Curso de Ciências Biológicas,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de  
Souza Fonseca Ribeiro**

**Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli**

**CURITIBA**

**2006**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram e tornaram possível a realização deste trabalho, e principalmente, a conclusão do curso de Ciências Biológicas:

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. *Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro* e ao Prof. Dr. *Iglenir João Cavalli*, pela oportunidade de estágio, orientação prestada, organização, aprendizado e sobretudo pela amizade. Vocês só fizeram aumentar a minha vontade de continuar estudando!

Aos *colegas* do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (todos, não dá pra citar nomes, é muita gente), pela vivência, amizade e momentos de descontração. Especialmente aos mais antigos, pelos ensinamentos e pela acolhida.

Às minhas *amigas* (*Ariane, Michelle, Sandra...*), simplesmente pela amizade e companheirismo.

E principalmente...

À minha irmã *Anna*, por me conhecer tão bem (desde antes de nascer!), por acreditar tanto em mim, pelos conselhos, pela amizade, cumplicidade...não há palavras que expressem minha gratidão por você! No fundo somos duas pessoas em uma, ou uma pessoa em duas, sei lá!

Aos meus “anjinhos”, *Cecilia e Sophia*, as crianças mais espertas, inteligentes e bonitas do MUNDO! Vocês alegram o meu dia todos os dias (até mesmo quando eu estou de mal humor)!

Aos meus pais, *João Carlos e Joseth*, que são os maiores incentivadores da minha vida acadêmica e profissional. Obrigado pela confiança, liberdade, paciência e pelo carinho. Vocês me ensinaram os melhores valores que uma pessoa pode receber! Ah, e obrigado pelo “paitrocínio”!

A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento real. É uma viagem, nunca uma chegada.

Karl Popper

## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>vii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 POLIMORFISMOS EM GENES DO BIOMETABOLISMO.....                       | 2          |
| 1.2 GENES DA SUPERFAMÍLIA DO CITOCROMO P450.....                        | 4          |
| 1.2.1 <i>CYP1A1</i> .....   | 4          |
| 1.2.2 <i>CYP2D6</i> .....   | 6          |
| 1.3 GENES DA FAMÍLIA GLUTATIONA S – TRANSFERASES.....                   | 7          |
| 1.3.1 <i>GSTP1</i> .....  | 8          |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>10</b>  |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                       | <b>11</b>  |
| 3.1 AMOSTRA.....  | 11         |
| 3.2 COLETA DO SANGUE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....                  | 11         |
| 3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....                                       | 12         |
| 3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DOS<br>PRODUTOS..... | 12         |
| 3.4.1 Polimorfismo <i>CYP1A1</i> – <i>Msp1</i> .....                    | 13         |
| 3.4.2 Polimorfismo <i>CYP2D6</i> – <i>BstN1</i> .....                   | 14         |
| 3.4.3 Polimorfismo <i>GSTP1</i> – <i>BsmA1</i> .....                    | 16         |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 18         |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>   | <b>20</b>  |
| 4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....                             | 20         |
| 4.2 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO.....   | 21         |
| 4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS.....                                | 23         |
| 4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS.....                        | 25         |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>28</b>  |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS.....</b> | <b>36</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ANEXOS.....</b>                           | <b>45</b> |
| <b>ANEXO I – Termo de Consentimento.....</b> | <b>45</b> |
| <b>ANEXO II – Questionário Pessoal.....</b>  | <b>46</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTANDO O GENE <i>GSTP1</i> , mRNA E PROTEÍNA CODIFICADA.....                                      | 1  |
| FIGURA 2 – PADRÃO DE BANDAS DO GENE <i>CYP1A1 - MSP1</i> .....  | 14 |
| FIGURA 3 – PADRÃO DE CLIVAGEM DO FRAGMENTO AMPLIFICADO PELOS PRIMERS C-44 E C-47 PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Msp1</i> ..... | 14 |
| FIGURA 4 – PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO <i>CYP2D6*4</i> .....   | 15 |
| FIGURA 5 – PADRÃO DE CLIVAGEM DO FRAGMENTO AMPLIFICADO PELOS PRIMERS D-1 E D-2 PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>BstN1</i> .....  | 16 |
| FIGURA 6 – PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO <i>GSTP1 - BSMA1</i> .....  | 17 |
| FIGURA 7 – PADRÃO DE CLIVAGEM DO PRODUTO AMPLIFICADO PELOS PRIMERS 105F E 105R PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>BsmA1</i> .....  | 17 |
| TABELA 1 – INICIADORES E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....   | 18 |
| TABELA 2 – PARÂMETROS CLÍNICOS ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....   | 23 |
| TABELA 3 – MÉDIA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS NAS MULHERES COM GENÓTIPO <i>CYP1A1 - MSP1 +/- E -/-</i> .....                     | 24 |
| TABELA 4 – MÉDIA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS NAS MULHERES COM GENÓTIPO <i>CYP2D6*4 +/- E -/-</i> .....                          | 24 |
| TABELA 5 – MÉDIA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS EM MULHERES COM GENÓTIPO <i>GSTP1 - BSMA1 +/- E -/-</i> .....                      | 25 |
| TABELA 6 – MÉDIA DO TAMANHO DO TUMOR NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE PACIENTES.....                                  | 26 |
| TABELA 7 – GRAU HISTOLÓGICO DOS CARCINOMAS NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE PACIENTES.....                            | 26 |
| TABELA 8 – ENVOLVIMENTO DE LINFONODOS NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE PACIENTES.....                                 | 26 |
| GRÁFICO 1 – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO.....   | 22 |
| GRÁFICO 2 – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO: GENÓTIPOS DE RISCO EM CONJUNTO.....   | 22 |



## RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres (INCA/MS, 2006). Admite-se que a exposição prolongada a níveis aumentados de estrogênio seja o fator central na etiologia do câncer de mama (BERNSTEIN, 2002). O objetivo deste trabalho foi investigar a associação entre o câncer de mama e polimorfismos em três genes atuantes na via metabólica do estrogênio (*CYP1A1*, *CYP2D6* e *GSTP1*). A amostra foi composta de 85 pacientes e 85 controles do sexo feminino, pareadas por idade ( $\pm 5$  anos) e etnia. Foram coletadas amostras de sangue periférico para extração de DNA pelo método de *salting out*, e em seguida realizou-se a análise molecular por PCR-RFLP, seguida de visualização em gel de agarose 3,0%. Nossos resultados não demonstraram associação entre a ocorrência de câncer de mama e os genótipos considerados de risco: **OR= 1,57 (IC 95%= 0,77 - 3,20)** para o polimorfismo *CYP1A1* – *Msp1*, **OR= 1,30 (IC 95%= 0,69 - 2,47)** para o polimorfismo *CYP2D6*\*4 e **OR= 1,69 (IC 95%=0,92 – 3,11)** para o polimorfismo *GSTP1* – *BsmA1*. Ao combinar os genótipos considerados de risco dos três genes, não observamos associações com um genótipo de risco (**OR= 1,28; IC 95%=0,61 – 2,70**), mas encontramos associação com dois ou três genótipos (**OR= 2,94; IC 95%=1,21 – 7,16**). Na análise dos parâmetros clínicos (idade da menarca, idade da menopausa, tempo entre menarca e menopausa, tempo de uso de pílulas anticoncepcionais, número de filhos e idade da primeira gravidez), encontramos diferenças entre pacientes e controles quanto à idade média da menarca (**t= 6,43; P<0,05**), e quando consideramos apenas pacientes e controles com os genótipos considerados de risco, quanto à idade média da menopausa (**t= 2,61; P>0,01** para o gene *GSTP1*) e média do tempo entre menarca e menopausa (**t= 2,18; P>0,02** para o gene *CYP1A1* e **t= 2,16; P>0,02** para o gene *GSTP1*). A análise dos parâmetros histopatológicos (grau histológico do tumor, envolvimento de linfonodos e tamanho do tumor) não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos considerados de risco e as pacientes homozigotas selvagens para cada um dos genes estudados. Portanto, uma interação entre os genes em estudo pode estar influenciando o risco ao câncer de mama, assim como alguns dos parâmetros clínicos analisados. Para corroborar estes e os outros resultados do trabalho, torna-se importante a ampliação da amostra utilizada.

Palavras-chave: câncer de mama; genes do biometabolismo; polimorfismo genético.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o câncer com maior mortalidade entre as mulheres (DAVIS et al., 1993). Estima-se que anualmente ocorram 999.000 novos casos no mundo, e 375.000 mortes (PARKIN et al., 2001). Para o ano de 2006, estimam-se 48.930 novos casos de câncer de mama no Brasil, o segundo mais incidente entre a população feminina, sendo o mais incidente o câncer de pele não-melanoma (INCA/MS, 2006). No Paraná, dados do INCA (2006) estimam 2.970 novos casos, sendo 700 em Curitiba. Embora sua etiologia ainda não seja completamente conhecida, sabe-se que fatores ambientais, genéticos, nutricionais e hormonais contribuem para o risco de desenvolver o câncer de mama (DAVIS et al., 1993).

A história familiar constitui um fator importante, principalmente se o câncer acometeu a mãe ou irmã e se desenvolveu antes da menopausa, aumentando o risco em duas a três vezes. A exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade (VAURY et al., 1995), obesidade pós-menopausa, ingestão de dieta gordurosa e consumo elevado de álcool também parecem aumentar o risco (PARKIN et al., 2001).

Admite-se que a exposição prolongada a níveis aumentados de estrogênio seja o fator central na etiologia do câncer de mama (BERNSTEIN, 2002). O risco é mais elevado principalmente em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (depois dos 50 anos de idade), nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, fizeram ou fazem uso de contraceptivos orais por longo tempo ou com dosagens elevadas de estrogênio e em mulheres que estão fazendo tratamento de reposição hormonal (PARKIN et al., 2001; COLLINS et al., 2005).

O hormônio estrogênio estimula a divisão celular no tecido mamário, o que pode aumentar o risco de ocorrência de danos permanentes ao DNA, principalmente em mulheres jovens, quando as células da mama ainda não estão totalmente maduras, não possuindo mecanismos eficientes de reparo do DNA, que se liga mais freqüentemente a carcinógenos (CHABNER e MURPHY, 2005). Acredita-se também que o estrogênio possua um efeito anti-apoptótico nas células expostas a esse hormônio, o que impede a morte das células que sofreram danos no DNA, e conseqüentemente em genes que

controlam o ciclo celular (NAROD e FOULKES, 2004). Além disso, os estrogênios catecóis podem agir como carcinógenos (LIEHR, 2000), se ligando ao DNA ou produzindo espécies de oxigênio reativas ao serem metabolizados. Várias enzimas do biometabolismo estão envolvidas nas vias metabólicas do estrogênio, como as que são codificadas pelos sistemas gênicos polimórficos que serão abordados neste trabalho.

O desenvolvimento do câncer irá depender de vários fatores, como o tempo e a intensidade de exposição a carcinógenos e a susceptibilidade genética do indivíduo. Sendo assim, a probabilidade de uma determinada célula sofrer transformação está diretamente relacionada a sua capacidade em metabolizar carcinógenos endógenos e exógenos e em reparar o DNA. Polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos, como os citocromos P450 (CYPs) e as glutatona S-transferases (GSTs), influenciam na resposta do indivíduo a estes agentes, visto que alelos diferentes condicionam fenótipos com maior ou menor capacidade de metabolização.

## 1.1 POLIMORFISMOS EM GENES DO BIOMETABOLISMO

Em geral, a maioria dos cânceres não ocorre apenas devido a mutações em genes de alta penetrância, como os genes supressores de tumor *BRCA1* e *2* (THIER et al., 2003) e oncogenes. Esse tipo de predisposição genética corresponde a aproximadamente 2% dos casos de câncer de mama (FORD et al., 1998; PETO et al., 1999). O desenvolvimento do câncer é consequência, principalmente, de complexas interações entre genes e entre gene – ambiente. Polimorfismos em genes do metabolismo tendem a ser muito mais comum nas populações e, portanto, tem uma importância considerável para o ponto de vista da saúde pública (THIER et al., 2003).

Um polimorfismo genético é definido como uma variação em um gene que é prevalente numa dada população à frequência de pelo menos 1% e não superior a 99%. Muitos genes polimórficos do metabolismo de xenobióticos mostram diferenças étnicas consideráveis quanto à sua distribuição alélica (GARTE et al., 2001).

Quanto ao metabolismo oxidativo de xenobióticos, muitos metabólitos precisam ser ativados pelas enzimas oxidativas da fase I para se tornarem reativos o suficiente para poderem se ligar ao DNA e exibirem atividade carcinogênica. Estas enzimas são principalmente aquelas pertencentes à Superfamília do Citocromo P450 (CYPs), que convertem um pró-carcinógeno em um carcinógeno, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato (NEBERT, 1991; PERERA, 1996; SHIMADA e FUJII-KURIAMA, 2004).

As enzimas da fase II, como as glutathione S-transferases (GSTs), estão envolvidas principalmente na detoxificação dos metabólitos primários gerados nas reações da fase I, por conjugação destes com um substrato endógeno (glutathione, sulfato, glicose, acetato). Estas enzimas agem como inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção rápida (NEBERT, 1991; PERSSON et al., 1995; THIER et al., 2003).

O balanço geral entre a ativação e detoxificação determina a dose final de um tóxico biologicamente ativo, o que pode influenciar o risco a doenças (THIER et al., 2003). Se as lesões no DNA ocorrerem em regiões funcionais de genes que controlam o ciclo celular, ativando ou inibindo a proliferação celular (oncogenes e genes supressores de tumor, respectivamente), o surgimento de um tumor, e consequentemente de um câncer, é favorecido. Para que uma célula adquira o caráter neoplásico, ela geralmente passa por vários eventos de mutações no DNA, que são cumulativas e irreversíveis (RIBEIRO et al., 2003).

Muitos genes da Superfamília do Citocromo P450 e da Família das Glutathione S-transferases envolvidos na ativação e detoxificação de xenobióticos são conhecidos pela presença de variantes alélicas polimórficas (MANNERVIK et al., 1985; NEBERT et al., 1996), sendo que foram encontradas algumas destas variantes dos genes *CYPs* e *GSTs* associadas a diversos tipos de câncer.

## 1.2 GENES DA SUPERFAMÍLIA DO CITOCROMO P450

O Citocromo P450 é na verdade uma família de proteínas muito semelhantes entre si, que catalizam reações de hidroxilação nas quais um substrato orgânico RH é hidroxilado a R-OH, com um átomo de O do O<sub>2</sub>; sendo o outro átomo de O reduzido a H<sub>2</sub>O por equivalentes redutores fornecidos pelo NADH ou NADPH. Podem reagir tanto com O<sub>2</sub> como com CO, e o complexo de sua forma reduzida com CO exibe forte absorção luminosa em 450nm, daí o nome P450 (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995).

Os produtos dos genes do citocromo P450 atuam nas reações de fase I, participando do metabolismo de substâncias exógenas (GOEPTAR et al., 1995 citado por ORELLANA e GUAJARDO, 2004) e também endógenas, como hormônios esteróides (CAPDEVILLA et al., 2002), incluindo o estrogênio. Muitos membros desta superfamília apresentam polimorfismos em humanos, sendo que já foram descritos pelo menos cinco subfamílias designadas de A a E pelo sistema de nomenclatura recomendado (NEBERT et al., 1987, 1993) . Já foram descritos 58 genes *CYPs* no genoma humano, sendo a maioria deles polimórficos (INGELMAN – SUNDBERG, 2001).

As reações mediadas por P450 são as vias principais através das quais a maior parte das drogas hidrofóbicas e agentes químicos ambientais são convertidos em formas que podem ser conjugadas e secretadas pelo organismo (KALANT e ROSCHLAV, 1991). Já o metabolismo do estrogênio mediado por *CYP* leva a formação de espécies de oxigênio reativas e adutos no DNA, com potencial mutagênico (SHIBUTANI et al., 1991; TERASHIMA et al., 2001; CHAKRAVARTI et al., 2001 citados por DAWLING et al., 2004).

### 1.2.1 *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* pertence a subfamília *CYP1*, e está mapeado no cromossomo 15 (15q22-q24) (HIDELBRAND et al., 1985). O *CYP1A1* humano codifica uma enzima muito bem conservada em tecidos epiteliais, que está envolvida na ativação de pró-carcinógenos do tabaco, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e aminas aromáticas, transformando-os em carcinógenos (THIER et al., 2003). O *CYP1A1* também está envolvido na produção de metabólitos carcinógenos do estrogênio (HAN et al., 2004). Até o momento já foram descritos 16 alelos polimórficos para este gene, sendo que quatro vêm sendo analisados quanto a uma possível associação com a susceptibilidade ao câncer: *CYP1A1\*2A*, *\*2B*, *\*3* e *\*4* (SMART e DALY, 2000; CHEVALIER et al., 2001; SAITO et al., 2003; AMORIN et al., 2004).

A frequência populacional dos vários alelos varia conforme o grupo étnico estudado, sendo que determinados genótipos são mais comuns em certas populações (GARTE, 1998). A incidência de câncer de mama não aparece como sendo claramente influenciada por polimorfismos no *CYP1A1* somente (BAILEY et al., 1998; DUNING et al., 1999). Porém há variações entre os grupos étnicos e em alguns casos, riscos elevados puderam ser associados a alelos de *CYP1A1*, como a odds ratio de 9,7 que foi calculada para a incidência de câncer de mama em afro-americanos com o alelo *\*2A* (TAIOLI et al., 1995). Mulheres caucasóides não apresentaram tal correlação (TAIOLI et al., 1999).

O alelo *CYP1A1\*2A* apresenta uma transição citosina (C) para timina (T) na região 3' flanqueadora do gene, na posição 6235, o que dá origem a um sítio para a enzima de restrição *Msp1* (KAWAJIRI et al., 1990). Este polimorfismo parece aumentar a expressão da enzima codificada pelo gene *CYP1A1* (ARVANITIS et al., 2001), aumentando a ativação de pró-carcinógenos. Em alguns estudos foi encontrada correlação entre os alelos *\*2A* (*Msp1*) e *\*2C* (1462V) e o câncer de pulmão (CHEN et al., 2001; QUINONES et al., 2001), porém em outros estudos as frequências alélicas

foram semelhantes entre os pacientes e controles pareados (CASCORBI et al., 1996; GSUR et al., 2001; YIN et al., 2001).

### 1.2.2 *CYP2D6*

O gene *CYP2D6* está mapeado em 22q13.1 e é o mais polimórfico entre os genes da Superfamília do Citocromo P450, com mais de 80 variantes alélicas descritas (BOGNI et al., 2005). Estas variantes são resultantes de mutações de ponto, adições, rearranjos gênicos e deleções ou duplicações do gene inteiro, resultando em um aumento, redução ou completa perda da atividade da enzima (INGELMAN – SUNDBERG e EVANS, 2001; MA, WOO e McLEOD, 2002; KITADA, 2003). Este gene participa do metabolismo de aproximadamente 25% de todas as medicações de uso clínico, como o tamoxifeno e alguns citotóxicos (WOLF e SMITH, 1999; INGELMAN – SUNDBERG e EVANS, 2001).

O *CYP2D6* codifica a enzima debrisoquina hidroxilase, cujo substrato inclui aminas aromáticas e nitrosaminas do tabaco (SOBTI et al., 2005), e participa do metabolismo da debrisoquina, um agente anti-hipertensivo.

Desde a identificação do polimorfismo no gene *CYP2D6*, na década de 70, muitos estudos mostraram que os vários fenótipos variam significativamente entre diferentes grupos étnicos (BERTILSSON, 1995; MA, WOO e McLEOD, 2002; EVANS e RELLING, 2004), e que este polimorfismo pode ter um papel importante na indução dos efeitos adversos da administração de alguns agentes terapêuticos (INGELMAN – SUNDBERG et al., 1999), como aqueles aplicados na oncologia. Muitos medicamentos usados comumente na oncologia são metabolizados via *CYP2D6*, e os polimorfismos neste gene podem potencialmente induzir importantes efeitos clínicos, que vão depender da droga envolvida e do genótipo do paciente (BERNARD et al., 2006).

Polimorfismos no gene *CYP2D6* podem ser classificados de acordo com quatro níveis de atividade: metabolizadores pobres (PMs), metabolizadores intermediários (IMs), metabolizadores rápidos (EMs) e metabolizadores ultra-rápidos (UMs) (JANN e

COHEN, 2000). O fenótipo EM é expresso pela maioria da população, sendo considerado como “normal” (EVANS e RELLING, 2004; ZANGER et al., 2004). As pessoas com o fenótipo PM herdaram os dois alelos *CYP2D6* deficientes, metabolizando as drogas em taxas notavelmente baixas, o que leva a um acúmulo de drogas não metabolizadas que são substratos da enzima P4502D6. Isto leva a um aumento dos efeitos adversos das drogas e interações medicamentosas, e uma baixa eficácia das drogas que precisam ser ativadas via *CYP2D6* (MA, WOO e McLEOD, 2002). A frequência deste fenótipo varia entre diferentes populações, e em geral caucasóides apresentam as maiores frequências (EVANS et al., 1980; DICK et al., 1982).

O fenótipo UM ocorre pela duplicação ou amplificação de genes *CYP2D6* ativos. Indivíduos com este fenótipo metabolizam as drogas a uma taxa muito alta, o que pode levar a uma perda na eficácia terapêutica destes medicamentos a doses padrão (INGELMAN – SUNDBERG et al, 1999; DAVIS e HOMSI, 2001). As maiores frequências para o fenótipo UM são reportadas para populações da Etiópia (29%) e Arábia Saudita (21%) (McLELLAN et al., 1997). Pessoas que são heterozigotas para um alelo *CYP2D6* defeituoso normalmente apresentam o fenótipo IM (MEYER, 2004), que tem um amplo espectro de atividades metabólicas.

O alelo mutante mais freqüente é o *CYP2D6\*4* (28,6%), que apresenta uma transição G – A na posição 1934 da molécula de DNA, gerando um produto não funcional (STUVEN et al., 1996; CARACO, 2004). Pessoas com esta mutação apresentam o fenótipo PM, com um risco elevado de efeitos colaterais ou falhas terapêuticas durante o tratamento com drogas metabolizadas pelo *CYP2D6* (STUVEN et al., 1996).

### 1.3 GENES DA FAMÍLIA GLUTATIONA S-TRANSFERASES (GSTs)

As enzimas glutathione S-transferases (GSTs) tem como função a detoxificação, mediando a conjugação de vários compostos eletrofílicos (como os metabólitos reativos



dos PAHs) com glutathione reduzida (GSH) (PICKETT e LU, 1989). Uma falta ou redução da atividade dessas enzimas, observada em indivíduos com o genótipo nulo ou com variantes polimórficas, pode causar o acúmulo de componentes metabólicos provenientes da primeira etapa do metabolismo de xenobióticos. Estes componentes podem formar adutos e provocar mutações em genes como oncogenes e/ou supressores tumorais, aumentando a probabilidade do desenvolvimento de uma neoplasia. Além disso, elas apresentam um papel importante na biotransformação do estrogênio (CAVALIERI et al., 1997), agindo na metabolização de esteróides e radicais livres produzidos pelo metabolismo deste hormônio. Desta forma, polimorfismos nos genes *GSTs* podem modificar o risco de desenvolvimento de câncer de mama (PARK et al., 2003).

Foram identificadas sete classes distintas para esta família (LANDI, 2002), sendo que em células mamárias predominam a expressão das classes *mu* e *pi* (EGAN et al., 2004).

### 1.3.1 *GSTP1*

O gene polimórfico da classe *pi*, *GSTP1*, está localizado no cromossomo 11 (11q13) (BOARD et al., 1989; MOSCOW et al., 1988), tem 2.8 k.b e contém 7 éxons. A enzima codificada contém 209 aminoácidos e é expressa nos pulmões, baço, coração placenta e nos tecidos mamários, onde é a GST predominante (KELLEY et al., 1994; PARL, 2005).

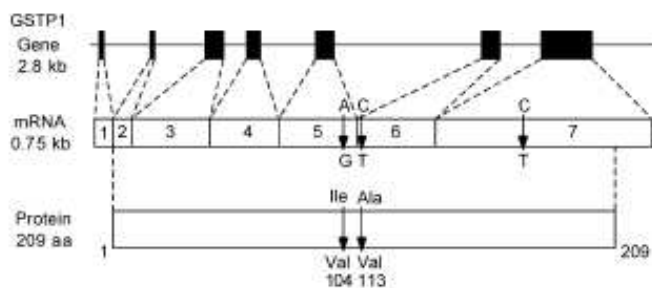
Quatro alelos polimórficos foram descritos, sendo o selvagem *GSTP1A*, e três variantes denominadas *GSTP1B*, *C* e *D*. Estes são resultado de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), um deles resultando na mudança do códon 104 (Isoleucina - Valina), e o outro no códon 113 (Alanina - Valina) (HATAGIMA, 2002). As formas mutantes do gene *GSTP1* codificam enzimas que têm sua atividade reduzida na detoxificação de xenobióticos (DUFOUR et al., 2005). Os alelos *A* e *D* codificam enzimas com o aminoácido isoleucina (*Ile*) na posição 104, e os aminoácidos alanina

(Ala) e valina (Val) na posição 113, respectivamente. Os alelos B e C possuem o aminoácido Val na posição 104, e os aminoácidos Ala e Val na posição 113, respectivamente. O alelo mais freqüente é o A, e o D o mais raro (WATSON et al., 1998). Enzimas com Val na posição 104 possuem uma atividade catalítica aumentada em sete vezes para PAHs 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). Sendo assim, sugere-se que portadores dos alelos B e C tenham probabilidade maior de desenvolver câncer de pulmão (RYBERG et al., 1997).

O genótipo *GSTP1*, em combinação com outros polimorfismos *GSTs*, modulam o risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Em mulheres na pré-menopausa, um leve aumento no risco foi observado na combinação *GSTM3\*B* e *GSTP1 Ile/Ile* (OR=2,07; 95%IC=1,02–4,18). No metabolismo do estrogênio, há uma complexa interação entre as isoenzimas do Citocromo P450, catecolamina O-metiltransferase (COMT-L) e isoenzimas *GSTs* (BOLT, 1981).

Recentemente foi reportada outra interação funcional entre os genes *GSTM1* e *GSTP1*. Em um estudo francês, os genótipos deficientes para *GSTM1* e *GSTP1* se mostraram, em conjunto, importantes modificadores para o risco de desenvolver câncer de pulmão (STUCKER et al., 2002).

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTANDO O GENE *GSTP1*, mRNA E PROTEÍNA CODIFICADA



FONTE: PARL, 2005.

## 2. OBJETIVOS

Como objetivo principal do projeto, pretende-se identificar marcadores moleculares que auxiliem na prevenção, prognóstico e principalmente na terapêutica de portadores de tumores mamários. Para isso, têm-se como objetivos específicos:

- Analisar a frequência dos genes *CYP1A1* – polimorfismo *Msp1*, *CYP2D6* – variante *CYP2D6\*4* e *GSTP1* – polimorfismo *BsmA1*, em portadoras de câncer de mama esporádico e controles;
- Correlacionar os diferentes genótipos em pacientes e controles com os fatores de risco: idade da menarca, idade da menopausa, tempo entre menarca e menopausa, tempo de uso de pílula anticoncepcional (tempo de exposição ao hormônio estrogênio), número de filhos e idade da primeira gravidez;
- Correlacionar os diferentes genótipos com a gravidade do estado clínico das pacientes através da análise do grau histológico dos carcinomas (I, II, ou III), tamanho do tumor (mm) e envolvimento de linfonodos (presença ou ausência);
- Comparar os resultados obtidos com outros trabalhos descritos na literatura.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRA**

Este trabalho foi realizado com amostras de sangue periférico de 85 mulheres portadoras de carcinomas mamários, pacientes dos hospitais Nossa Senhora das Graças e Hospital de Clínicas de Curitiba, e de 85 mulheres sem evidências de carcinomas mamários (controles, indivíduos pertencentes aos bancos de DNA do LIGH – Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade – e do Laboratório de Mutagênese da UEL, entre moradoras do Asilo Maria Teresa, de São José dos Pinhais e entre outras doadoras voluntárias), que foram pareadas por idade ( $\pm 5$  anos) e etnia. Foi realizado um contato pessoal com cada paciente e controle a fim de preencher um formulário com as informações pertinentes ao trabalho (anexo II) e o consentimento informado (anexo I). O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG, Curitiba - PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003.

#### **3.2 COLETAS DO SANGUE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS**

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. Foram coletados cerca de 10ml de sangue de cada indivíduo, o qual foi colocado imediatamente 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) e mantidos a 4°C até o momento do processamento.

### 3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para o processamento do sangue, cerca de 10ml de sangue periférico foram centrifugados com tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X a 2000 rpm por 10 minutos. Este processo foi repetido até obter um botão de glóbulos brancos, livre de hemácias, ao qual foram adicionadas três gotas da solução PBS e centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos. Então, foi realizada a extração do DNA sanguíneo pelo método de *salting out*, segundo BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações, que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular. Este método consiste no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA por etanol.

Após a extração do DNA a amostra foi ressuspensa em 50 µl de água ultrapura e armazenada a -20° C. Foi realizada a leitura da densidade óptica do DNA com o espectrofotômetro Gene Quant pro, e preparadas soluções de uso na concentração de 20ng/µl.

### 3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DOS PRODUTOS

Os polimorfismos foram identificados pela técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a amplificação de cada um dos locos a serem estudados, e a seguir realizada a clivagem dos produtos de amplificação com as respectivas enzimas de restrição e visualização dos polimorfismos através de eletroforese em gel de agarose 3,0% (juntamente com marcador de peso molecular 50pb, para identificação das bandas), já estando previamente padronizadas as condições de amplificação e análise dos produtos. Os géis foram analisados em transluminador de luz UV e documentados em sistema de captação de imagens pelo software "Digi doc-it".

### 3.4.1 Polimorfismo *CYP1A1* – *Msp1*

O polimorfismo *CYP1A1-Msp1* é atribuído à presença (CCGG) ou ausência (CTGG) do sítio de restrição *Msp1*, no éxon 7, posição 6235, na região flanqueadora 3' da molécula de DNA, e representa uma transição de C para T (GOTO et al., 1996; FONTANA et al., 1998). Para a amplificação deste gene (PCR) foram utilizados os iniciadores C-44 e C-47, segundo o protocolo de CARSTENSEN et al. (1993) modificado:

0,3 µl (20 pMol) dos iniciadores C-44 e C-47 (Gibco-BRL);

0,3 µl (25 mM) de dNTP's (Gibco-BRL);

2,5 µl U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL);

5,0 µl de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl 10X concentrado (Gibco-BRL);

2,0 µl (50 mM) de MgCl<sub>2</sub> (Gibco-BRL);

1,0 µl de DNA genômico total;

Água ultra-pura estéril para completar o volume.

A seguir foi realizada a reação de clivagem com a enzima de restrição *Msp1*:

10 µl da reação de PCR;

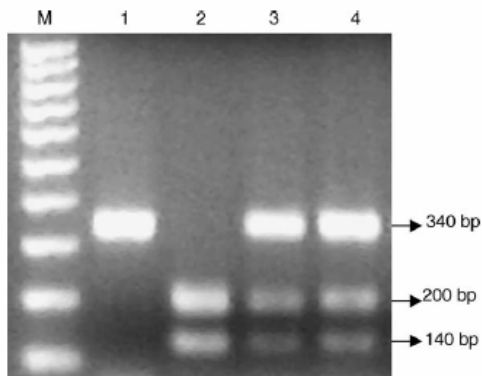
1,5U de enzima de restrição *Msp1* (Gibco-BRL);

1,4 µl de tampão da enzima: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10X concentrado;

2,45 µl de água ultra-pura estéril.

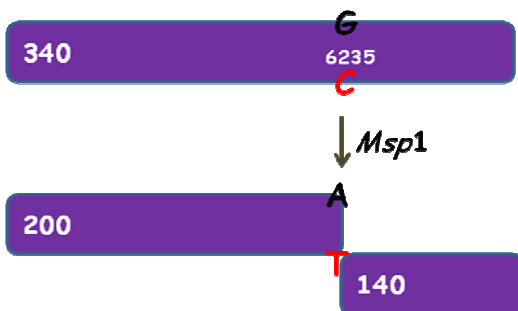
Essa reação foi mantida a 37°C por 3 horas. O genótipo homozigoto selvagem (*m1/m1* ou *+/+*) é representado por um produto de amplificação de 340pb, o qual não sofre ação da enzima de restrição *Msp1*. O genótipo homozigoto mutante (*m2/m2* ou *-/-*) possui um sítio para a enzima de restrição *Msp1*, que cliva o produto de amplificação e gera duas bandas de 200pb e 140pb. O genótipo heterozigoto (*m1/m2* ou *+/-*) apresenta as três bandas de 340, 200 e 140pb (CARSTENSEN et al., 1993) (ver FIGURA 2).

FIGURA 2 - PADRÃO DE BANDAS DO GENE *CYP1A1* - *MSP1*



Coluna M: marcador de peso molecular de 50pb; coluna 1: genótipo homozigoto selvagem (+/+); coluna 2: genótipo homozigoto mutante (-/-); colunas 3 e 4: genótipo heterozigoto (+/-).

FIGURA 3 – PADRÃO DE CLIVAGEM DO FRAGMENTO AMPLIFICADO PELOS PRIMERS C-44 E C-47 PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Msp1*.



### 3.4.2 Polimorfismo *CYP2D6\*4*

O polimorfismo *CYP2D6\*4* é atribuído à presença ou ausência do sítio de restrição *Bst*N1 pela mudança de base G – A na posição 1934 da molécula de DNA na junção intron 3/ exon 4 do gene, gerando um produto não funcional (CARACO, 2004).

Para a amplificação deste gene (PCR) foi utilizado o par de *primers* D-1 e D-2, segundo o protocolo abaixo:

200  $\mu$ M de dNTPs;

1x PCR buffer;

2,5 U de Taq DNA polimerase;

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>;

0,5  $\mu$ M de cada primer;

Completo-se o volume final de 50  $\mu$ M de água ultra-pura.

Então, foi realizada clivagem com a enzima de restrição *Bst*N1, segundo as especificações:

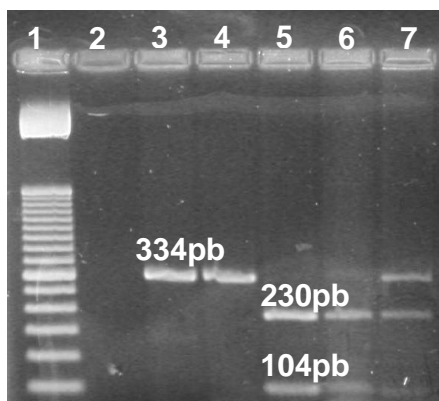
10  $\mu$ L de produto de PCR;

1 U da enzima *Bst*N1;

1x tampão da enzima.

A reação foi incubada a 60°C por 3 horas. O genótipo homozigoto selvagem (A1/A1) é representado por duas bandas de 230 e 104pb, pois possui um sítio para a enzima de restrição *Bst*N1, que cliva o produto de amplificação. O genótipo homozigoto mutante (A2/A2) não possui sítio de restrição para esta enzima de restrição, sendo representado por uma banda única, não clivada, de 334pb. O genótipo heterozigoto (A1/A2) apresenta as três bandas de 230,104 e 334pb (CARACO, 2004) (ver FIGURA 2).

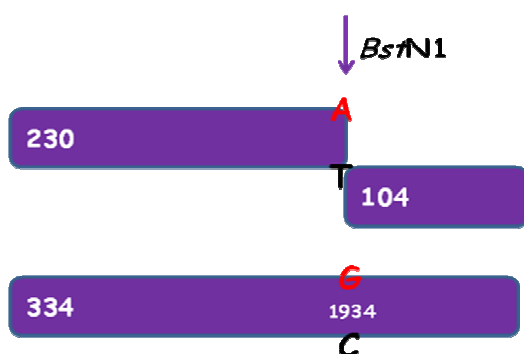
FIGURA 4 - PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO *CYP2D6*\*4





Coluna 1: marcador de peso molecular de 50pb; coluna 2: controle negativo; colunas 3 e 4: genótipo homocigoto mutante; colunas 5 e 6: genótipos homocigoto selvagem; coluna 7: genótipo heterocigoto.

FIGURA 5 – PADRÃO DE CLIVAGEM DO FRAGMENTO AMPLIFICADO PELOS PRIMERS D-1 E D-2 PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bst*I.



### 3.4.3 Polimorfismo *GSTP1* – *Bsm*A1

O polimorfismo *Bsm*A1 no gene *GSTP1* ocorre devido à presença ou ausência do sítio de restrição para a enzima de restrição *Bsm*A1 na molécula de DNA. O par de iniciadores P105F e P105R foi utilizado para a PCR, de acordo com HARRIES et al. (1997), nas seguintes condições:

Tampão 10x (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4);

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>;

2 mM dNTPs;

100 ng/μl de cada iniciador;

1,25 U de Taq DNA polimerase;

100 ng/μl de DNA genômico.

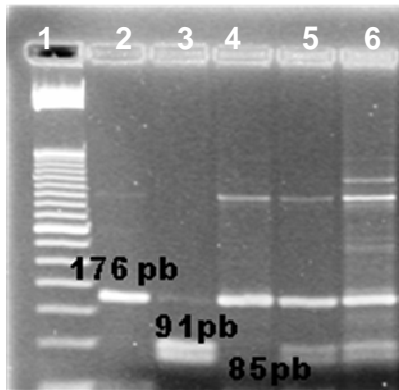
A reação de clivagem com a enzima de restrição *Bsm*A1 foi realizada segundo o protocolo abaixo:

20 μl do produto da PCR;

5U da enzima *BsmA1*.

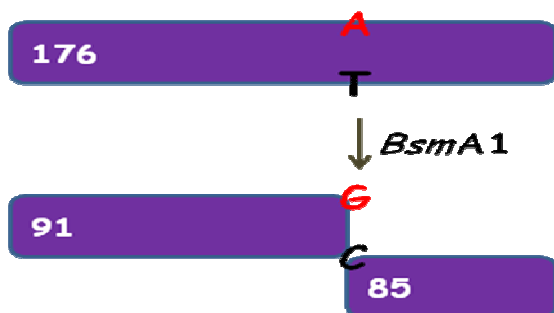
A reação foi incubada a 55° C por 3 horas. O genótipo homozigoto selvagem (*Ile/Ile*) apresenta um produto de amplificação de 176pb, o qual não sofre ação da enzima *BsmA1*, originando uma banda não-clivada. O genótipo homozigoto mutante (*Val/Val*) possui um sítio para a enzima de restrição *BsmA1*, que cliva o produto inicial, gerando um produto de amplificação com uma banda de 91pb e outra de 85pb. A amplificação do genótipo heterozigoto gera um produto com as três bandas - uma de 176 pb, uma de 91 pb e uma de 85 (HARRIES et al., 1997) (ver FIGURA 3).

FIGURA 6 – PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO *GSTP1* – *BSMA1*



Coluna 1: marcador de peso molecular 50 pb; colunas 2 e 4: homozigoto selvagem, coluna 3: homozigoto mutante; colunas 5 e 6: heterozigotos.

FIGURA 7 – PADRÃO DE CLIVAGEM DO PRODUTO AMPLIFICADO PELOS PRIMERS 105F E 105R PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *BsmA1*.



A seguir a TABELA 1, com o tamanho (pb) dos fragmentos gerados, os *primers* específicos para a análise de cada polimorfismo e as condições de amplificação utilizadas:

TABELA 1 - INICIADORES E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

| Gene e Tamanho do Fragmento                | Iniciadores  | Condições de Reação   |
|--|--|---|
| <b>CYP1A1 (Msp1)</b><br>340, 200 e 140pb.  | C44 (5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3')<br>C47 (5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3')               | 94°C/5 min; 30 ciclos<br>(94°C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/1,5 min)<br>72°C/2 min |
| <b>CYP2D6 (BstM1)</b><br>334, 230 e 104pb. | D1 (5'-GCCTTCGCCAACCACTCCG-3')<br>D2 (5'-AAATCCTGCTCTCCGAGGC-3')                     | 94°C/5 min; 30 ciclos<br>(94°C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/1 min) 72°C/6 min      |
| <b>GSTP1 (BsmA1)</b><br>176, 91 e 85pb.    | P105F (5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3')<br>P105R (5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3') | 95°C/5 min; 30 ciclos<br>(94°C/30 s, 57°C/30 s, 72°C/30 s); 72°C/5 min        |

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As freqüências genótípicas observadas para os três genes foram comparadas com as freqüências esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, conforme BEIGUELMAN, 1998.

Para analisar a presença ou ausência de associação entre as variantes polimórficas estudadas e o câncer de mama, foram comparadas as freqüências gênicas observadas para estes genes entre indivíduos portadores de câncer e seus controles, através de tabelas de contingência 2X2, para se obter os valores de P (o valor de  $P > 0,05$  foi adotado como limite de significância). Os valores de Odds Ratio (OR) foram determinados pelo Teste exato de Fisher com o auxílio do programa RXC (MILLER, 1997).

O Teste do qui-quadrado foi realizado para verificar se os genótipos observados se distribuíam igualmente entre pacientes e controles.

Para a análise dos fatores de risco (idade da menarca e menopausa, tempo entre menarca e menopausa, tempo de uso de pílula anticoncepcional, número de filhos

e idade da primeira gestação) com os genótipos considerados de risco (homozigotos mutantes e heterozigotos), foi realizado o teste  $t$  de Student entre as médias obtidas para cada parâmetro no grupo de pacientes e no grupo de controles. O mesmo teste foi aplicado para avaliar a relação entre o tamanho do tumor (em mm) das pacientes e os genótipos de risco. Já para a análise do grau histológico dos carcinomas (I, II ou III) e o envolvimento dos linfonodos (presença ou ausência de metástases nos linfonodos), foi feito o teste de qui-quadrado. O valor de  $P > 0,05$  também foi usado como limite de significância.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

A média de idade nas pacientes foi de  $58,62 \pm 13,55$  anos, e nos controles foi de  $56,46 \pm 13,45$  anos, não havendo diferenças significativas entre as médias dos dois grupos ( $t=1,04$ ;  $P>0,20$ ).

Para o gene *CYP1A1-Msp1*, das 85 pacientes, foram observadas 61 (72%) com o genótipo homocigoto selvagem (*m1/m1* ou *+/+*), 22 (26%) com o genótipo heterocigoto (*m1/m2* ou *+/-*) e 2 (2%) com o genótipo homocigoto mutante (*m2/m2* ou *-/-*). As frequências alélicas observadas nas pacientes foram de 0,847 para o alelo selvagem e 0,153 para o alelo mutante. Do total de 85 controles, 68 (80%) são portadoras do genótipo homocigoto selvagem, 16 (19%) são heterocigotas e 1 (1%) é homocigota mutante. As frequências alélicas dos controles foram 0,894 para o alelo selvagem e 0,106 para o alelo mutante. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas entre pacientes e controles ( $\chi^2_2=1,66$ ;  $P>0,30$ ). As frequências genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg tanto nas pacientes ( $\chi^2_1=0,0000474$ ;  $P>0,99$ ) quanto nos controles ( $\chi^2_1=0,003$ ;  $P>0,95$ ).

Para o gene *CYP2D6\*4*, das 85 pacientes analisadas, 54 (63%) tem o genótipo homocigoto selvagem (*A1/A1* ou *+/+*), 27 (32%) o genótipo heterocigoto (*A1/A2* ou *+/-*) e 4 (5%) o genótipo homocigoto mutante (*A2/A2* ou *-/-*). As frequências alélicas observadas nas pacientes foram de 0,794 para o alelo selvagem e 0,206 para o alelo mutante. Entre os 85 controles, observamos 59 (69%) mulheres com o genótipo homocigoto selvagem, 20 (24%) heterocigotas e 6 (7%) homocigotas mutantes. As frequências alélicas dos controles foram 0,812 para o alelo selvagem e 0,188 para o alelo mutante. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas entre pacientes e controles ( $\chi^2_2=1,66$ ;  $P>0,30$ ). As frequências

genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg nas pacientes ( $\chi^2_1=0,07$ ;  $P>0,70$ ), mas não nos controles ( $\chi^2_1=4,50$ ;  $P<0,05$ ), portanto não podemos comparar os dados dos controles para este polimorfismo com outros descritos na literatura.

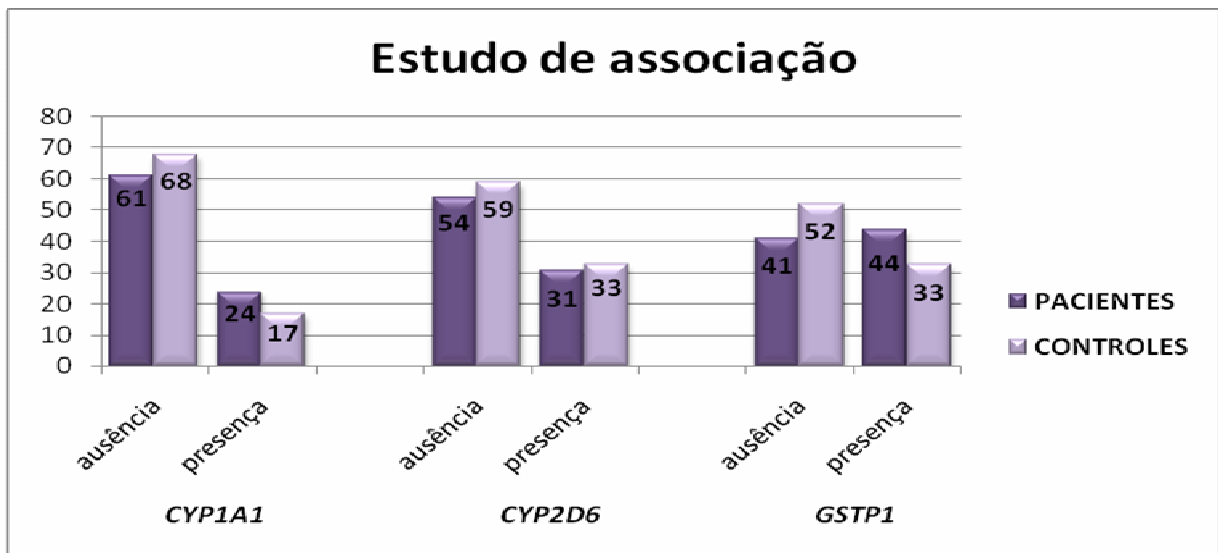
Para o gene *GSTP1*, das 85 pacientes estudadas, 41 (48%) apresentam o genótipo homozigoto selvagem (*Ile/Ile*), 32 (38%) são heterozigotas (*Ile/Val*) e 12 (14%) apresentam o genótipo homozigoto mutante (*Val/Val*). As freqüências alélicas observadas nas pacientes foram de 0,671 para o alelo selvagem e 0,329 para o alelo mutante. Entre os controles pareados, 52 (61%) mulheres apresentam o genótipo homozigoto selvagem, 29 (34%) são heterozigotas e 4 (5%) são homozigotas mutantes. As freqüências alélicas dos controles foram 0,782 para o alelo selvagem e 0,218 para o alelo mutante. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genotípicas entre pacientes e controles ( $\chi^2_2=5,44$   $P>0,05$ ). As freqüências genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg nas pacientes ( $\chi^2_1=1,85$ ;  $P>0,1$ ), e nos controles ( $\chi^2_1=0,0002$ ;  $P>0,95$ ).

#### 4.2 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Para os três genes estudados não encontramos associações entre a presença dos genótipos de risco e a suscetibilidade ao câncer de mama. Consideramos como de risco, os genótipos homozigoto mutante e heterozigoto, devido ao pequeno número de indivíduos homozigotos mutantes observados para cada polimorfismo. Os valores do risco relativo calculado para estes polimorfismos foram: OR=1,57 (IC 95%= 0,77 - 3,20) para o polimorfismo *CYP1A1* – *Msp1*, OR=1,30 (IC 95%= 0,69 - 2,47) para o polimorfismo *CYP2D6\*4* e OR=1,69 (IC 95%=0,92 – 3,11) para o polimorfismo *GSTP1-BsmA1*. Os dados de pacientes e controles com os genótipos de risco e selvagens para cada polimorfismo estão representados no GRÁFICO 1.

Ao calcular as razões de probabilidade considerando os genótipos considerados de risco em conjunto, também não foram encontradas associações com o câncer de mama para mulheres com um genótipo considerado de risco (pacientes n=40, controles n=46): **OR=1,28 (IC 95%= 0,61 – 2,70)**. Fizemos uma análise conjunta entre mulheres com dois ou três genótipos de risco (pacientes n=28, controles n=14) devido ao pequeno número de pacientes e controles com três genótipos de risco (pacientes=3; controles=2), e foi encontrada associação com o câncer de mama: **OR=2,94 (IC 95%=1,21 – 7,16)**. Os dados estão representados no GRÁFICO 2.

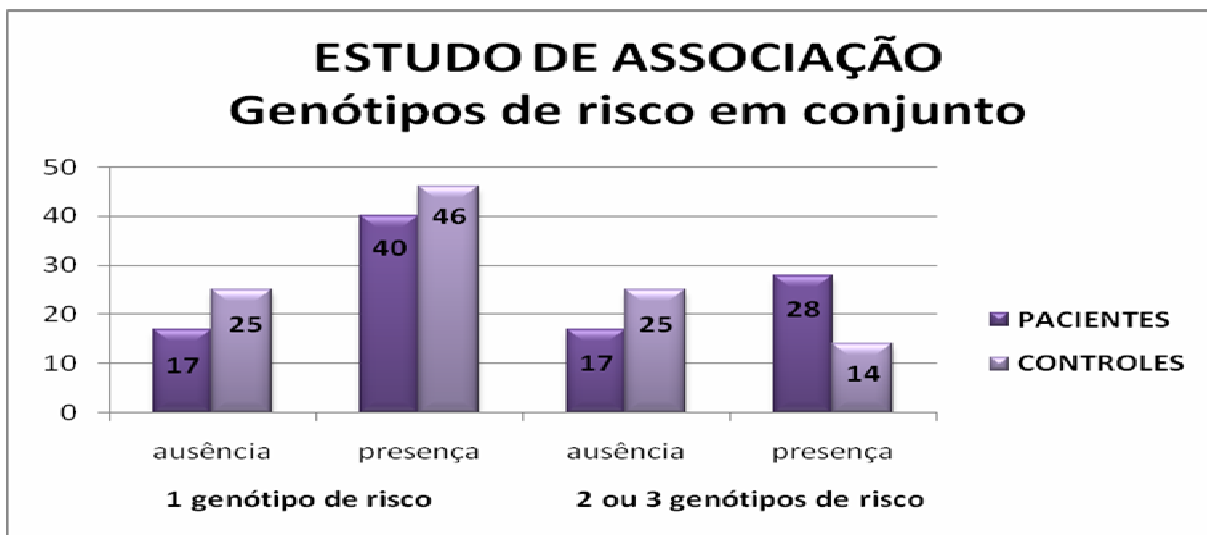
GRÁFICO 1 – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO



NOTA: ausência= genótipos selvagens (+/+); presença = genótipos de risco (+/- e -/).

GRÁFICO 2 – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO: GENÓTIPOS DE RISCO EM CONJUNTO





NOTA: ausência = genótipos selvagens (+/+); presença = genótipos de risco (+/- e -/-).

#### 4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

Os questionários utilizados nas entrevistas foram avaliados para se obter informações sobre a atividade hormonal (do estrogênio) nas mulheres do estudo, sendo que os parâmetros clínicos analisados foram: idade da menarca e da menopausa, tempo entre menarca e menopausa (tempo de exposição ao estrogênio), tempo de uso de pílulas anticoncepcionais (exposição ao estrogênio exógeno), número de filhos e idade da primeira gravidez. Considerando que nem todas as mulheres responderam a todas as questões do questionário, o número amostral variou nos cálculos dos diferentes parâmetros. Os resultados da análise estatística destes parâmetros estão apresentados na TABELA 2, juntamente com os valores de significância. Apenas a idade média da menarca diferiu significativamente entre pacientes e controles ( $t=6,43$ ;  $P<0,05$ ). As médias de todos os outros parâmetros não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre o grupo das pacientes e dos controles.

TABELA 2 - PARÂMETROS CLÍNICOS ENTRE PACIENTES E CONTROLES

|               | Menarca                  |                 | Menopausa       |                 | Menopausa -<br>menarca |                 | Pílula         |                | Nº de filhos   |                | Idade da 1ª<br>gravidez |                 |
|---------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------|-----------------|
|               | P(71)                    | C(48)           | P(63)           | P(41)           | P(56)                  | C(40)           | P(25)          | C(18)          | P(61)          | C(31)          | P(40)                   | C(29)           |
| <b>média</b>  | 15,5<br>± 1,79           | 13,50<br>± 1,45 | 48,86<br>± 4,45 | 47,78<br>± 5,43 | 35,68<br>± 4,65        | 34,54<br>± 5,46 | 8,82<br>± 7,51 | 6,72<br>± 7,05 | 2,79<br>± 1,70 | 3,25<br>± 1,57 | 23,92<br>± 4,71         | 22,73<br>± 4,52 |
| <b>Testes</b> | <b>t=6,43; P&lt;0,05</b> |                 | t=1,11; P>0,20  |                 | t=1,10; P>0,20         |                 | t=0,93; P>0,30 |                | t=1,24; P>0,30 |                | t=1,06; P>0,20          |                 |

NOTA: (P) = pacientes; (C) = controles.

Também foi avaliada a significância das diferenças das médias dos parâmetros clínicos em pacientes e controles com os genótipos considerados de risco para cada polimorfismo (*CYP1A1* – *Msp1* +/- e -/-, *CYP2D6*\*4 +/- e -/- e *GSTP1* – *BsmA1* +/- e -/-). Os resultados estão apresentados nas TABELAS 3, 4 e 5.

TABELA 3 - MÉDIA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS NAS MULHERES COM GENÓTIPO *CYP1A1* – *MSP1* +/- E -/-

|               | Menarca         |                 | Menopausa       |                 | Menopausa –<br>menarca   |                 | Pílula          |                | Nº de filhos   |               | Idade da 1ª gravidez |                 |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|----------------------|-----------------|
|               | P (16)          | C (10)          | P (16)          | C (08)          | P (12)                   | C (08)          | P (06)          | C (03)         | P (15)         | C (06)        | P (09)               | C (06)          |
| <b>média</b>  | 12,69<br>± 2,02 | 14,00<br>± 1,15 | 49,25<br>± 4,80 | 45,87<br>± 3,72 | 36,5<br>± 4,89           | 31,87<br>± 4,26 | 10,11<br>± 8,64 | 4,83<br>± 4,54 | 2,53<br>± 1,25 | 2,5<br>± 1,38 | 23,89<br>± 5,21      | 23,17<br>± 5,88 |
| <b>Testes</b> | t=1,86; P>0,05  |                 | t=1,74; P>0,05  |                 | <b>t=2,18; P&lt;0,05</b> |                 | t=0,97; P>0,30  |                | t=0,05; P>0,90 |               | t=0,25; P>0,80       |                 |

NOTA: (P) = pacientes; (C) = controles.

Para os genótipos *CYP1A1-Msp1* +/- e -/- , só foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles quanto ao tempo entre menarca e menopausa (**t=2,18; P<0,05**). Os demais parâmetros não diferiram estatisticamente.

TABELA 4 - MÉDIA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS NAS MULHERES COM GENÓTIPO *CYP2D6\*4 +/- E -/-*

|                | Menarca         |                 | Menopausa       |                 | Menopausa - menarca |                 | Pílula         |                  | Nº de filhos   |                | Idade da 1ª gravidez |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------------|-----------------|
|                | P(28)           | C(14)           | P (25)          | C(11)           | P(25)               | C(11)           | P(13)          | C(04)            | P(26)          | C(09)          | P(21)                | C(08)           |
| <b>média</b>   | 13,07<br>± 1,72 | 13,64<br>± 1,39 | 49,64<br>± 3,99 | 48,36<br>± 5,41 | 36,44<br>± 4,18     | 34,34<br>± 4,67 | 8,37<br>± 7,09 | 14,75<br>± 10,63 | 2,42<br>± 1,1  | 2,89<br>± 1,17 | 23,86<br>± 3,69      | 21,37<br>± 4,84 |
| <b>Teste t</b> | t=1,07; P>0,20  |                 | t=0,79; P>0,40  |                 | t=1,34; P>0,10      |                 | t=1,41; P>0,10 |                  | t=1,09; P>0,20 |                | t=1,48; P>0,10       |                 |

NOTA: (P) = pacientes; (C) = controles.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles com os genótipos *CYP2D6\*4 +/-* e *-/-* para nenhum dos fatores de risco analisados.

TABELA 5 - MÉDIA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS EM MULHERES COM GENÓTIPO *GSTP1 – BSMA1 +/- E -/-*

|                | Menarca         |                 | Menopausa       |                 | Menopausa - menarca |                 | Pílula         |                | Nº de filhos   |               | Idade da 1ª gravidez |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------------|-----------------|
|                | P (39)          | C (18)          | P (34)          | C (16)          | P (31)              | C (16)          | P (15)         | C (07)         | P (37)         | C (12)        | P (27)               | C (12)          |
| <b>Media</b>   | 13,28<br>± 1,75 | 13,06<br>± 1,59 | 49,35<br>± 3,82 | 45,94<br>± 5,21 | 35,93<br>± 4,04     | 32,81<br>± 5,75 | 9,78<br>± 7,39 | 5,43<br>± 3,99 | 2,76<br>± 1,93 | 3,5<br>± 1,78 | 23,81<br>± 4,68      | 24,92<br>± 5,53 |
| <b>Teste t</b> | t=0,45; P>0,60  |                 | t=2,61; P<0,05  |                 | t=2,16; P<0,05      |                 | t=1,45; P>0,10 |                | t=1,17; P>0,20 |               | t=0,65; P>0,50       |                 |

NOTA: (P) = pacientes; (C) = controles.

Para os genótipos *GSTP1 – BsmA1 +/-* e *-/-*, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles quanto à idade média da

menopausa ( $t=2,61$ ;  $P<0,05$ ) e ao tempo médio entre menarca e menopausa ( $t=2,16$ ;  $P<0,05$ ). Os demais parâmetros não diferiram estatisticamente.

#### 4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

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 6, 7 e 8, respectivamente.

TABELA 6 - MÉDIA DO TAMANHO DO TUMOR NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE PACIENTES

|                  | <i>CYP1A1</i>       |                | <i>CYP2D6</i>       |                | <i>GSTP1</i>        |                |
|------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
|                  | +/+ (49)            | +/- e -/- (18) | +/+ (46)            | +/- e -/- (22) | +/+ (36)            | +/- e -/- (32) |
| <b>Média</b>     | 37,64 ± 16,32       | 32,16 ± 16,57  | 35,00 ± 14,85       | 38,04 ± 19,33  | 38,81 ± 14,67       | 32,85 ± 17,79  |
| <b>Teste - t</b> | $t=1,21$ ; $P>0,20$ |                | $t=0,17$ ; $P>0,80$ |                | $t=1,51$ ; $P>0,10$ |                |

As médias dos tamanhos dos tumores não diferiram significativamente entre pacientes com genótipos considerados de risco e pacientes com genótipos selvagens para os três polimorfismos estudados.

TABELA 7 - GRAU HISTOLÓGICO DOS CARCINOMAS NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE PACIENTES

|                       | <i>CYP1A1</i>            |           | <i>CYP2D6</i>            |           | <i>GSTP1</i>             |           |
|-----------------------|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
|                       | +/+                      | +/- e -/- | +/+                      | +/- e -/- | +/+                      | +/- e -/- |
| Grau I                | 12                       | 04        | 11                       | 06        | 08                       | 09        |
| Grau II               | 38                       | 10        | 28                       | 18        | 21                       | 26        |
| Grau III              | 09                       | 07        | 12                       | 03        | 10                       | 04        |
| <b>Qui - quadrado</b> | $\chi^2=3,27$ ; P > 0,10 |           | $\chi^2=1,83$ ; P > 0,30 |           | $\chi^2=3,16$ ; P > 0,20 |           |

Os graus dos carcinomas observados se distribuíram homoganeamente entre mulheres com os genótipos considerados de risco e os genótipos selvagens para os três polimorfismos estudados.

TABELA 8 - ENVOLVIMENTO DE LINFONODOS NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE PACIENTES

|                       | <i>CYP1A1</i>            |           | <i>CYP2D6</i>             |           | <i>GSTP1</i>             |           |
|-----------------------|--------------------------|-----------|---------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
|                       | +/+                      | +/- e -/- | +/+                       | +/- e -/- | +/+                      | +/- e -/- |
| Ausente               | 25                       | 13        | 26                        | 12        | 16                       | 22        |
| Presente              | 31                       | 09        | 27                        | 12        | 21                       | 18        |
| <b>Qui - quadrado</b> | $\chi^2=1,31$ ; P > 0,20 |           | $\chi^2=0,006$ ; P > 0,90 |           | $\chi^2=1,06$ ; P > 0,30 |           |

A presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais também se distribuiu homoganeamente entre as pacientes com genótipos considerados de risco e as pacientes com genótipos selvagens para os três polimorfismos. Assim, não encontramos diferenças significativas entre os diferentes genótipos para nenhum dos parâmetros histopatológicos analisados.

## 5. DISCUSSÃO

São conhecidos muitos fatores ambientais e 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, número de filhos 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 (COLLINS et al., 2005) e tratamento de reposição hormonal. Assim, a análise de polimorfismos genéticos relacionados à atividade enzimática de ativação e detoxificação de carcinógenos, incluindo o estrogênio, aliada a fatores ambientais de risco já conhecidos, pode fornecer importantes informações para a avaliação do risco de desenvolvimento da doença.

O risco de desenvolver câncer de mama por alterações genéticas nos genes do biometabolismo não é tão relevante como o determinado por mutações em genes de alta penetrância, como os genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2*. Porém, alterações nos genes do biometabolismo incluem uma porcentagem muito maior de indivíduos, podendo gerar um maior impacto epidemiológico nas populações humanas, além de influenciar nas taxas de metabolização do hormônio estrogênio, que é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama feminino.

Neste trabalho foram analisados polimorfismos dos genes *CYP1A1* (*CYP1A1* – *Msp1*), *CYP2D6* (*CYP2D6*\*4) e *GSTP1* (*GSTP1* – *BsmA1*) e a susceptibilidade ao câncer de mama, em um estudo tipo caso-controle, pareado por idade e grupo étnico. Pacientes e controles tiveram médias de idade que não diferiram estatisticamente ( $58,62 \pm 13,55$  e  $56,46 \pm 13,45$  respectivamente;  $t=1,04$ ;  $P>0,2$ ), o que era de se esperar, já que um dos critérios para a escolha dos controles foi a idade.

As freqüências genotípicas observadas para o gene *CYP1A1-Msp1* distribuíram-se igualmente nas pacientes e nos controles ( $\chi^2_2=1,66$ ;  $P>0,30$ ) e as duas amostras apresentaram freqüências genotípicas concordantes com o teorema de Hardy-Weinberg

( $\chi^2_1=4,74.10^{-5}$ ;  $P>0,99$  para as pacientes e  $\chi^2_1=0,003$ ;  $P>0,95$  para os controles), demonstrando que são representativas de populações em equilíbrio genético para este polimorfismo. Estas frequências são semelhantes às descritas por LI et al. (2004), numa amostra da população da Carolina do Norte, que também não encontraram associação para o polimorfismo *CYP1A1-Msp1* com o câncer de mama. Os resultados das frequências gênicas dos controles também foram próximos dos obtidos por GARTE et al. (2001), que trabalharam com um grande número amostral (4453 controles). 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 identificar outros erros metodológicos.

As frequências genóticas observadas para o gene *CYP2D6\*4* se mostraram semelhantes entre pacientes e controles ( $\chi^2_2=1,66$ ;  $P>0,30$ ). No grupo das pacientes, não observamos diferenças estatisticamente significativas da distribuição genotípica em relação ao Teorema de Hardy-Weinberg ( $\chi^2_1=0,07$ ;  $P>0,70$ ), mas encontramos diferenças significantes no grupo dos controles ( **$\chi^2_1=4,50$ ;  $P<0,05$** ), o que indica que a amostra de controles não se encontra em equilíbrio genético para este polimorfismo, provavelmente devido ao tamanho da amostra, inviabilizando a comparação dos dados com outros já descritos na literatura. As frequências alélicas entre as pacientes estão de acordo com as descritas por WOLF et al, (1992) ( $\chi^2_2= 0,3$ ;  $P>0,80$ ). TOPIC et al. (2000) analisaram a prevalência do alelo \*4 do gene *CYP2D6* em pacientes portadores de carcinomas mamários e de cabeça e pescoço. Entre as portadoras de carcinomas mamários, foram analisados 76 pacientes e 144 controles. No grupo de pacientes, a frequência do alelo \*4 foi de 31,6%, enquanto que no grupo controle foi de 20,8%, diferença estatisticamente significativa, mostrando que entre as pacientes o alelo mutante foi mais frequente, ao contrário de nossos dados, onde a frequência do alelo \*4 nas pacientes foi de 20,6%, e nos controles de 18,8%.

As frequências genóticas observadas para o gene *GSTP1 – BsmA1* distribuíram-se igualmente nas pacientes e nos controles ( $\chi^2_2=5,44$   $P>0,05$ ) e as duas

amostras apresentaram freqüências genóticas concordantes com o teorema de Hardy-Weinberg ( $\chi^2_1=1,85$ ;  $P>0,1$  para as pacientes e  $\chi^2_1=0,0002$ ;  $P>0,95$  para os controles), indicando que foram obtidas de populações que estão em equilíbrio genético. As freqüências observadas não diferem significativamente das de SWEENEY et al. (2000),  $\chi^2_2=1,16$ ,  $P>0,50$ ; que analisaram o gene *GSTP1* em 240 pacientes de câncer de mama.

O estudo de associação não demonstrou resultados significativos entre os genótipos de risco estudados e a susceptibilidade ao câncer de mama: *CYP1A1 – Msp1* (+/- e -/-) OR=1,57 (IC95%: 0,77 – 3,20); *CYP2D6\*4* (+/- e -/-) OR=1,30 (IC95%: 0,69 – 2,47) e *GSTP1 – BsmA1* (+/- e -/-) OR=1,69 (IC95%: 0,92 – 3,11). Esses dados não estão de acordo com os descritos por LADONA et al. (1996). Estes autores realizaram um estudo caso-controle envolvendo 187 mulheres portadoras de carcinomas mamários e 151 controles, e descreveram uma associação positiva entre o câncer de mama e a presença do alelo mutante do gene *CYP2D6\*4* em homozigose (OR=1,7; IC 95%=1,06-3,11), sendo que a associação era mais pronunciada em pacientes na pós-menopausa e com outros tipos histológicos que não o ductal invasor, quando havia associação mesmo em heterozigose (OR=1,81; IC 95% = 1,06-3,11), concluindo que a presença do alelo mutante era um fator independente de risco. Já para o gene *CYP1A1-Msp1*, TAIOLI et al. (1995) e BAILEY et al. (1998), analisando populações caucasóides americanas, também não encontraram associação positiva com o câncer de mama. Neste mesmo estudo, TAIOLI et al. descreveram uma associação em mulheres afro-americanas (OR = 9,7; IC 95%: 2,0-47,9). AMORIM et al. (2002), analisando uma população caucasóide brasileira, também não encontrou associação com o câncer de mama para o polimorfismo *CYP1A1 – Msp1*, OR : 0,91; IC 95% = 0,49 -1,66. Muitos estudos demonstram que as freqüências alélicas dos genes do biometabolismo diferem entre etnias e/ou regiões geográficas específicas. Um estudo caso – controle realizado por CHACKO et al. (2005) com uma amostra de 224 mulheres indianas, mostrou associação entre os genótipos de risco do polimorfismo *CYP1A1 – Msp1* (*m2/m2* e



*m1/m2*) e a ocorrência de câncer de mama, com OR: 3,8 (IC95%= 1,6 – 9,1) para mulheres na pré-menopausa e OR: 2,9 (IC95%= 1,3 – 6,6) para mulheres na pós-menopausa. Para o polimorfismo *Ile/Val* no gene *GSTP1*, GUDMUNDSDOTTIR et al (2001) não encontraram associação entre os genótipos de risco e o câncer de mama (OR:1,15; IC95%=0,86-1,52 para os indivíduos heterozigotos e OR:1,39; IC95%=0,91-2,12 para os indivíduos homozigotos mutantes) para uma amostra de 500 pacientes e 395 controles de uma população da Islândia. MITRUNEN et al (2001) também não encontraram associação (OR: 0,88; IC95%=0,66-1,18 para o genótipo *Ile/Val* e OR: 0,57; IC95%=0,31-1,04 para o genótipo *Val/Val*) para uma população de mulheres na pré e pós – menopausa na Finlândia.

Alguns estudos analisam a combinação de diferentes genes e seus genótipos considerados de risco, com o objetivo de analisar o efeito interativo destes genes. Sabe-se que os genes do biometabolismo não agem isoladamente e a avaliação de múltiplos genes interagindo entre si pode ser necessária para compreender a relação entre determinado polimorfismo e o desenvolvimento do câncer de mama. Neste trabalho, analisamos pacientes e controles com um, dois e três genótipos considerados de risco. Encontramos uma associação positiva entre a presença de dois ou três genótipos de risco e o câncer de mama, com **OR: 2,94; (IC95%= 1,21 – 7,16)**, o que mostra que no grupo das pacientes há um aumento significativo de mulheres com dois ou três genótipos de risco em relação aos controles, sugerindo que a ação interativa de dois ou mais genes pode estar influenciando na predisposição ao câncer de mama. Para pacientes com um genótipo de risco não foi encontrada tal associação, com OR:1,28 (IC95%= 0,61 – 2,70). Este risco de quase três vezes de desenvolver câncer de mama em portadoras de dois ou mais alelos mutantes dos genes analisados deve ser observado com cautela, porém não devemos menosprezar sua importância, já que estatisticamente, a chance deste resultado ter ocorrido ao acaso é de apenas 5,0%. Nesse sentido, torna-se bastante importante aumentar o tamanho amostral e refazer a análise, para ver se a associação persiste.

HELZLSOUER et al. (1998) encontraram um risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama associado com o aumento do número de genótipos considerados de risco dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* (104 *Val/Val*), com OR = 3,77; IC 95% = 1,10-12,88. Já MITRUNEN et al. (2001) não encontraram associação para esta combinação de genótipos. MILLIKAN et al (2000) encontraram o menor risco para mulheres com os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos e *GSTP1* 104 *Val/Val* ou *Ile/Val*. VOGL et al. (2004), em uma meta-análise com 2048 pacientes e 1969 controles, também não encontraram associação com o câncer de mama em portadoras dos genótipos mutantes dos genes *GSTT1/GSTP1*, *GSTM1/GSTP1* e *GSTT1/GSTM1/GSTP1* [OR: 2.16 (0.70– 6.64), 0.93 (0.52– 1.66) e 1.41 (0.37– 5.41), respectivamente].

A análise dos fatores de risco: idade da menopausa, tempo entre menarca e menopausa, tempo de uso de pílulas anticoncepcionais, número de filhos e idade da primeira gravidez entre pacientes e controles não demonstrou diferenças estatisticamente significativas, sugerindo, no nosso estudo, que estes parâmetros não são relevantes para o desenvolvimento do câncer mamário. Deve-se considerar que algumas pacientes e controles não responderam completamente as informações clínicas no questionário, determinando que, para certos parâmetros, o tamanho amostral ficasse ainda mais reduzido e, portanto, que os resultados acima sejam interpretados com cautela. O mesmo deve ser considerado para o resultado estatisticamente significativo, idade média da menarca, entre pacientes e controles (**t = 6,43; P < 0,05**), quando os controles demonstraram média inferior, diferentemente do esperado. Como o tempo médio entre menarca e menopausa não diferiu significativamente entre pacientes e controles, não podemos sugerir um aumento no tempo de exposição ao estrogênio endógeno no grupo dos controles devido à média da idade da menarca ser menor. Diversos estudos já demonstraram associação entre estes fatores e um maior risco de desenvolver o câncer de mama, como a meta análise realizada pelo *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* (1996), que, compilando dados de 54 trabalhos, encontraram um pequeno aumento do risco em

mulheres que utilizavam contraceptivos hormonais orais, com OR= 1,24; IC 95%=1,15-1,33.

Quando analisamos estes mesmos fatores entre pacientes e controles com os genótipos considerados de risco (heterozigotos e homozigotos mutantes) para cada um dos três polimorfismos estudados, encontramos resultados significativos para o tempo médio entre menarca e menopausa em portadoras dos genótipos de risco para o gene *CYP1A1* ( $t=2,18$ ;  $P>0,02$ ) e *GSTP1* ( $t=2,16$ ;  $P>0,02$ ) e para a idade média da menopausa ( $t=2,61$ ;  $P>0,01$ ) em portadoras dos genótipos de risco de *GSTP1*. Nestes casos também deve ser levado em conta o tamanho da amostra, principalmente entre os controles de *CYP1A1* ( $n=8$ ), o que torna o resultado obtido pouco consistente. Quanto aos resultados significativos obtidos na análise dos parâmetros clínicos entre pacientes e controles com os genótipos de risco do gene *GSTP1*, pacientes apresentaram médias de idade da menopausa e do tempo entre menarca e menopausa maiores em relação aos controles, mostrando um tempo de exposição ao estrogênio endógeno maior, o que pode aumentar o risco de ocorrência da doença. Devido a relevância deste resultado, o mesmo deve ser avaliado com mais rigor, portanto uma ampliação do tamanho da amostra torna-se importante para corroboração.

A análise dos parâmetros histopatológicos, tamanho do tumor, graus dos carcinomas e presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais, não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre as pacientes com genótipos considerados de risco e selvagens para cada um dos três genes estudados. Portanto, neste estudo os genes analisados podem estar influenciando o risco de ocorrência da doença (como já observado nos resultados anteriores), mas não a gravidade da mesma.

As controvérsias observadas entre alguns resultados que foram obtidos neste trabalho com o que já foi descrito anteriormente podem ocorrer devido a fatores biológicos, como as diferentes distribuições gênicas em diferentes etnias (PHAROAH et al., 2004), a exposição a fatores ambientais (DUNNING et al., 1999) e também devido a fatores metodológicos (erros tipo I e II em amostras de tamanho reduzido, como

sugerido por LOCHMUELLER et al., 2003). Sabe-se também que os genes do biometabolismo não agem isoladamente e a avaliação de múltiplos genes (mais que três) interagindo entre si e com a exposição aos carcinógenos pode ser necessária para compreender a verdadeira relação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento do câncer de mama.

Segundo PHAROAH et al. (2004), uma amostra de 1000 pacientes e 1000 controles seria necessária para detectar um alelo de susceptibilidade co-dominante, com frequência de 0,20 e conferindo um risco relativo de 1,5. No entanto, a obtenção de um tamanho amostral ideal é praticamente inviável para um único grupo de pesquisa, e dessa forma, deve ser considerado que amostras classificadas como de tamanho não ideal, obtidas por diferentes grupos de pesquisa com uma abordagem metodológica semelhante, se analisados em conjunto, podem fornecer informações valiosas nos estudos de associação.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a distribuição das freqüências genótípicas dos genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *GSTP1* não diferiu significativamente entre pacientes e controles quando analisados isoladamente. Encontramos associação entre a presença de dois ou mais genótipos de risco com o câncer de mama, conferindo um risco relativo 2,94 vezes maior em mulheres portadoras desta combinação de genótipos. Este resultado deve ser observado com cautela, mas sugere uma interação entre os genes analisados quanto ao risco de desenvolvimento da doença.

As médias dos diferentes parâmetros clínicos, na maioria, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as pacientes e controles, apenas a idade média da menarca, em que os controles apresentaram uma média inferior. Entretanto, como o tempo entre menarca e menopausa não diferiu significativamente entre os dois grupos, não podemos descartar o fato de esta diferença ocorrer ao acaso, nem sugerir que ela esteja influenciando no tempo de exposição ao estrogênio endógeno.

Quando consideramos apenas pacientes e controles com os genótipos considerados de risco para cada polimorfismo, a idade média da menopausa (*GSTP1* – *BsmA1*) e o tempo médio entre menarca e menopausa (*CYP1A1* – *Msp1* e *GSTP1* – *BsmA1*) diferiram significativamente, sendo que todos os outros parâmetros não apresentaram diferenças significativas. Devemos levar em conta que nem todas as mulheres responderam as informações clínicas nos questionários, diminuindo o tamanho amostral para este tipo de análise. Quanto aos resultados significativos do gene *GSTP1*, pacientes apresentaram médias de idade da menopausa e do tempo entre menarca e menopausa maiores em relação aos controles, mostrando um tempo de exposição ao estrogênio endógeno maior, o que pode aumentar o risco de ocorrência da doença. Uma ampliação da amostra torna-se importante para analisarmos com maior rigor este resultado.

Não detectamos diferenças estatisticamente significativas entre as médias do tamanho dos tumores, distribuição dos diferentes graus histológicos e presença ou

ausência de metástases em linfonodos regionais em pacientes com os genótipos considerados de risco e selvagens, portanto neste estudo, os genes analisados não estão influenciando na gravidade da doença.

Para corroborar os resultados obtidos neste trabalho, mesmo estando de acordo com a gama de controvérsias já descritas na literatura, faz-se necessário aumentar o tamanho da amostra de estudo. Nossos resultados sugerem que os genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *GSTP1*, 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 entre si e/ou com outros genes, na carcinogênese mamária humana.

## 7. REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

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.

BERNARD, S.; NEVILLE, K.A.; NGUYEN, A.N.; FLOCKHART, D.A. Interethnic Differences in Genetic Polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. Population: Clinical Implications. **The Oncologist**. v. 11, n. 2, p. 126-135, 2006.

BERNSTEIN, I. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 7(1):3-15, 2002.

BERTILSSON, I. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. **Clin Pharmacokinet**, 29(3):192-209, 1995.

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.

BOGNI, A.; MONSHOUWER, M.; MOSCONE, A.; HIDESTRAND, M.; INGELMAN – SUNDBERGER, M.; HARTUNG, T.; COECKE, S. Substrate Specific Metabolism by Polymorphic Cytochrome P4502D6 alleles. **Toxicology In Vitro**; 19: 621 –629; 2005.

BOLT, B. A breast feeding circle. **Health Visit**, 54(6):245, 1981.

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

CARACO, Y. Genes and the Response to Drugs. **The New England Journal of Medicine**;351(27)2867-9;2004.

CASCORBI, I.; BROCKMOLLER, J.; ROOTS, I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. **Cancer Res**, 1;56(21):4965-9, 1996.

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.

CHABNER, B. A.; MURPHY, M. J. Jr. Breast cancer: a tale of two centuries: with implications for understanding cancer metastasis and cancer stem cell biology. **Oncologist**; 10(6):369; 2005.

CHACKO, P.; JOSEPH, T.; MATHEW, B.S.; RAJAN, B.; PILLAI, M.R. Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome. **Mutation Research**, 581: 153–163, 2005.

CHEN, M.; LIN, S.; ZHENG, W. Therapeutic effect of medical therapy upon undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: analysis of 149 cases. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. 25; 81(24):1488-9, 2001.

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.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER: Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. **Lancet** , 347:1713-1727, 1996

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



DAVIS, D. L.; BRADLOW, H.L.; WOLFF, M.; WOODRUFF, T.; HOEL, D.G.; ANTON-CULVER, H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. **Environ Health Perspect.** 101(5): 372–377, 1993.

DAVIS, M.P.; HOMSI, J. The importance of cytochrome P450 monooxygenase CYP2D6 in palliative medicine. **Support Care Cancer**, 9(6):442-51, 2001.

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.

DICK, F.R.; ARMITAGE, J.O. BURNS, C.P. Diagnostic concurrence in the subclassification of adult acute leukemia using French-American-British criteria. **Cancer**, 1;49(5):916-20, 1982.

DUFOUR, C.; SVAHN, J.; BACIGALUPO, A.; LONGONI, D.; VAROTTO, S.; IORI, A. P.; BAGNASCO, F.; LOCASCIULLI, A.; MENNA, G.; RAMENGI, U.; LANCIOTTI, M. Genetic polymorphisms of *CYP3A4*, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* and *NQO1* and the risk of acquired idiopathic aplastic anemia in Caucasian patients. **Hem. J.**, v. 90, n. 8, p. 1027-1031, 2005.

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.

EVANS, J.E.; DICK, R.; SHERLOCK, S. Focal nodular hyperplasia of the liver. **Br J Surg.** 67(3):175-7, 1980.

EVANS, W.E.; RELLING, M.V. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. **Nature**, 429(6990):464-8, 2004.

FORD, H.L.; KABINGU, E.N.; BUMP, E.A.; MUTTER, G.L.; PARDEE, A.B. Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 95(21):12608-13, 1998.

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.

GSUR, A.; HAIDINGER, G.; HOLLAUS, P.; HERBACEK, I.; MADERSBACHER, S.; TRIEB, K.; PRIDUN, N.; MOHN-STAUDNER, A.; VETTER, N.; VUTUC, C.; MICKSCHE, M. Genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 and lung cancer risk. **Anticancer Res**, 21(3C):2237-42, 2001.

GUDMUNDSOTTIR, K.; TRYGGVADOTTIR, L.; EYFJORD, J.E. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev**, 10(11):1169-73. 2001.

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.

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.

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.

INGELMAN – SUNDBERG, M.; EVANS, W.E. Unravelling the functional genomics of the human CYP2D6 gene locus. **Pharmacogenetics**, 11(7):553-4, 2001.

JANN, M.W.; COHEN, L.J. The influence of ethnicity and antidepressant pharmacogenetics in the treatment of depression. **Drug Metabol Drug Interact**, 16(1):39-67, 2000.

KALANT, H.; ROSCHLAV, W. H. E; **Princípios de Farmacologia Médica**. 5<sup>a</sup> Ed. Guanabara-Koogan. 687 pp, 1991.

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.

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.

KITADA, T.; SEKI, S.; SAKAGUCHI, H.; SAWADA, T.; HIRAKAWA, K.; WAKASA, K. Clinicopathological significance of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human pancreatic carcinoma. **Histopathology**, 43(6):550-5, 2003.

LADONA, M. G.; ABILDÚA, R. E.; LADERO, J. M.; ROMÁN, J. M.; PLAZA, M. A.; AGÚNDEZ, J. A. G.; MUÑOZ, J. J.; BENÍTEZ, J. CYP2D6 genotypes in Spanish women with breast cancer. **Cancer Letters**; 99: 23-28; 1996.

LANDI, G.; LANDI, C. The sentinel node biopsy in melanoma patients. **Dermatol Nurs**, 13(6):429-34, 441, 2002.

LEHNINGER, A. L. & NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo, Sarvier. p. 33-34; 238. 1995.

LI, Y.; MILLIKAN, R. C.; BELL, D. A.; CUI, L.; TSE, C. J.; NEWMAN, B.; CONWAY, K. Cigarette smoking, cytochrome p4501A1 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.

LOHMUELLER, K. E.; PEARCE, C. L.; PIKE, M.; LANDER, E. S.; HIRSCHHORN, J. N. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. **Nature Genet.** 33: 177-182, 2003.

MA, M.K.; WOO, M.H.; McLEOD, H.L. Genetic basis of drug metabolism. **Am J Health Syst Pharm**, 59(21):2061-9, 2002.

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.

MCLELLAN, R.A.; OSCARSON, M.; ALEXANDRIE, A.K.; SEIDEGÅRD, J.; EVANS, D.A.P.; RANNUG, A.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Characterization of a Human Glutathione S-Transferase  $\mu$  Cluster Containing a Duplicated GSTM1 Gene that Causes Ultrarapid Enzyme Activity. **Mol Pharmacol**, v. 52, Issue 6, 958-965, 1997.

MEYER, V.F. Effects of estrogen-only treatment in postmenopausal women. **JAMA**, 292(6):683-4; author reply 685-6, 2004.

MILLIKAN, R.; PITTMAN, G.; TSE, C.K.; 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.

MITRUNEM, K.; JOURENKOVA, N.; KATAJA, V.; ESKELINEN, M.; KOSMA, V.M.; BENHAMOU, S.; et al. Glutathione S-transferaseM1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev**, 10: 229 – 236, 2001.

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.

NAROD, S. A.; FOULKES, W. D. BRCA1 and BRCA2. **Nature Reviews.**; 4: 665-676; 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. Elevated estrogen 16 alpha-hydroxylase activity: is this a genotoxic or nongenotoxic biomarker in human breast cancer risk? **J. Natl. Cancer Inst**, 85(23):1888-91, 1993.

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.

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

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.

PARL, F.F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Letters**, 221: 123 –129, 2005.

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

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.

PETO, J.; COLLINS, N.; BARFOOT, R.; SEAL, S.; WARREN, W.; RAHMAN, N.; EASTON, D.F.; EVANS, C.; DEACON, J.; STRATTON, M.R. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients With Early-Onset Breast Cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, n. 11, 943-949, 1999.

PHAROAH, P.D.; DUNNING, A.M.; PONDER, B.A.; EASTON, D.F. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. **Nature Reviews of Cancer**. (11):850 - 60, 2004.

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

QUINONES, L.; LUCAS, D.; GODOY, J.; CACERES, D.; BERTHOU, F.; VARELA, N.; LEE, K.; ACEVEDO, C.; MARTINEZ, L. AGUILERA, A.M.; GIL, L. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. **Cancer Lett**, 174(1):35-44, 2001.

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

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.

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.

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.

SOBIT, R. C.; AL-BADRAN, A. I.; SHARMA, S.K.; SHARMA, S. K.; KRISHAN, A.; MOHAN, H. Genetics polymorphisms of CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genes and bladder cancer risk in North India. **Cancer Genetics and Cytogenetics**; 156: 68 – 73; 2005.

STÜCKER, I.; HIRVONEN, A.; WAZIERS, I.; CABELGUENNE, A.; KATJA MITRUNEN, K.; CÉNÉE, K.; KOUM-BESSON, E.; HÉMON, D.; BEAUNE, P.; LORIOT, M.A. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. **Carcinogenesis**, 23(9):1475-81, 2002.

STUVEN, T.; GRIESE, E.U.; KROEMER, H.K.; EICHELBAUM, M.; ZANGER, U.M. Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance- and multiplex-polymerase chain reaction. **Pharmacogenetics**, 6(5):417-21.

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.

SWEENEY, C.; McCLURE, G.Y.; FARES, M.Y.; STONE, A.; COLES, B.F.; THOMPSON, P.A.; KOROURIAN, S.; HUTCHINS, L.F.; KADLUBAR, F.F.; AMBROSONE, C.B. Association between Survival after Treatment for Breast Cancer and Glutathione S-Transferase P1 Ile<sup>105</sup>Val Polymorphism. **Cancer Research**, 60: 5621-5624, 2000.

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  $\mu$ ) as a marker for susceptibility to lung cancer: a follow-up study. **Carcinogenesis**, 11: 33-36, 1999.

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.

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.

VOGL, F.D.; TAIOLI, E.; MAUGARD, C.; ZHENG, W. ; PINTO, L.F.R.; AMBROSONE, C.; PARL, F.F.; NEDELICHEVA-KRISTENSEN, V.; REBBECK, T.R.; BRENNAN, P.; BOFFETTAL, P. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and Breast Cancer: A Pooled Analysis. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 13(9), 2004.

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.

WOLF, C. R.; SMITH, C. A. D; GOUGH, A. C.; MOSS, J. E.; VALLIS, K. A.; HOWARD, G.; GAREY, F. J.; MILLS, K.; MCNEE, W.; CARMICHAEL, J.; SPURR, N. K. Relationship between the debrisoquine hydroxylase polymorphism and cancer susceptibility. **Carcinogenesis**; 13: 1035–1038; 1992.

YIN, L.; PU, Y.; LIU, T.Y.; TUNG, Y.H.; CHEN, K.W.; LIN, P. Genetic polymorphisms of NAD(P)H quinone oxidoreductase, CYP1A1 and microsomal epoxide hydrolase and lung cancer risk in Nanjing, China. **Lung Cancer**, 33(2-3):133-41, 2001.

ZANGER, U.M.; RAIMUNDO, S.; EICHELBAUM, M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. [Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.](#) 369(1):23-37. Epub 2003 Nov 15, 2004.

## ANEXOS

### ANEXO I – 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 n° \_\_\_\_\_

## HISTÓRIA PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: \_\_\_\_\_
- 2- Sexo: ( ) M ( ) F; Peso atual (kg): \_\_\_\_\_ ; Altura: \_\_\_\_\_
- 3- A qual grande grupo étnico você pertence ?  
Negróide ( ) Caucasóide ( ) 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 ( ) brasilit-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<br>(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 alcólicas 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):**

---

---