

**CAROLINA SENS ABUÁZAR**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO TIPO CASO- CONTROLE DO POLIMORFISMO  
CYP17MSPA1 EM CÂNCERES MAMÁRIOS ESPORÁDICOS**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Aluno: Carolina Sens Abuázar

Orientador: Profa. Dr. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro- UFPR

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

**CURITIBA  
2005**

## **Agradecimentos**

"Nada é possível sem a ajuda daqueles que acreditam em você e no seu trabalho".

A realização deste projeto não seria possível sem a ajuda de professores, colegas e amigos . Em especial gostaria de agradecer ao meus pais, a minha orientadora Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, ao meu co-orientador Dr. Iglénir João Cavalli, e a professora Dra. Roselli Wasen. Também contribuíram muito para a realização deste trabalho as minhas colegas de laboratório Márcia Maria Costa de Oliveira, Clarissa Torresan e Roberta Losi-Guembarovski. Agradeço também ao médico, Dr. Rubens Silveira Lima, do Hospital Nossa Senhora das Graças. E finalmente ao grande responsável por tudo isso, DEUS.

## SUMÁRIO

• Introdução.....	1
• Objetivos.....	6
• Material e Métodos.....	7
• Figura 1.....	11
• Análise Estatística.....	12
• Resultados.....	13
• Tabela 1.....	15
• Tabela 2.....	17
• Tabela 3.....	18
• Tabela 4.....	18
• Discussão.....	19
• Conclusões.....	23
• Referências Bibliográficas.....	24
• Apêndice I.....	27
• Apêndice II.....	30

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Carcinoma Mamário- Aspectos gerais

O carcinoma mamário é a malignidade mais comum em mulheres nos países ocidentais, observando-se um aumento de 1 a 2% de casos anuais (PANDIS et al., 1995). Estimou-se para o ano de 2005, na população feminina brasileira, a ocorrência de 49470 novos casos de câncer de mama, representando aproximadamente 20% dos 216.035 casos de câncer entre mulheres (INCA/MS, 2005), constituindo-se no segundo tipo mais freqüente no mundo e a mais comum causa de morte por câncer entre as mulheres.

Durante as três últimas décadas foi possível o delineamento da biologia e patologia do câncer. A hipótese de que o processo carcinogênico é composto por múltiplas etapas, nas quais um conjunto de eventos contribui para a transformação celular e subseqüentes estágios malignos, é hoje amplamente aceita (COMFORTI-FROES e ROSSIT, 2000).

Dentro deste contexto, a susceptibilidade genética e a sua relação com os fatores ambientais adquirem grande importância. Alguns exemplos de fatores ambientais são: exposição esporádica ou seqüencial a carcinógenos químicos, radiação ionizante e não ionizante e os estados inflamatórios crônicos (bacterianos, virais ou parasitários). O estilo de vida, incluindo o hábito tabagista e a dieta e outros fatores como etnia, sexo, idade, também influenciam as taxas de incidência e mortalidade por câncer.

Admite-se que um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama seja uma prolongada exposição a níveis elevados de estrôgenio. O mecanismo de atuação do estrogênio na carcinogênese mamária envolveria um estímulo proliferativo das células epiteliais que possibilitaria uma maior ocorrência de mutações espontâneas (cf. revisões de THOMPSON e AMBROSONE, 2000; YAGER, 2000; MITRUNEN e HIRVOEN, 2003). THOMAS et al. (1997) e HANKINSON et al. (1998) correlacionaram os índices de estrôgenio plasmático ao risco de desenvolvimento do câncer de mama.

Portanto, um sistema de reparo eficiente é fundamental na manutenção da integridade do genoma e a probabilidade de uma determinada célula sofrer transformação está diretamente relacionada à sua capacidade em metabolizar carcinógenos (endógenos e exógenos) e em reparar o seu DNA.

O processo através do qual os carcinógenos são metabolizados é dividido em duas fases: fase I - biossíntese, com a participação de enzimas do metabolismo oxidativo, especialmente as enzimas da superfamília do citocromo *P-450* (*CYPs*); fase II - degradação ou detoxificação, com a participação, por exemplo, das glutathione S- transferases (*GSTs*). Durante a primeira fase ocorre a introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato, fazendo com que um pró-carcinógeno possa tornar-se carcinógeno, como o benzo[a]pireno que é convertido em epóxido de benzo[a]pireno. As reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathione, sulfato, glicose, acetato) tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção. Assim, o equilíbrio entre estas duas fases pode conferir sensibilidade individual diferenciada (CONFORTI-FROES e ROSSIT, 2000).

Será dada ênfase à Fase I da via de Biometabolismo, mais especificamente ao Gene *CYP17*, pertencente à super família Citocromo P450, devido ao fato deste gene ser o objetivo do presente estudo.

## 1.2 *CYP17* e Síntese de Estrogênio

O gene *CYP17* está localizado no cromossomo 10 (10q24.3) e contém 8 éxons e 7 introns (KRISTENSEN et al., 1999). Codifica a enzima citocromo P450c17 $\alpha$ , a qual está envolvida na síntese de estrôgenio humano (AMBROSONE et al., 2003). Esta enzima apresenta um sítio ativo bifuncional: uma atividade catalítica que realiza a 17  $\alpha$ -hidroxilação de pregnolona e de progesterona; e uma atividade liase que é responsável pela conversão de 17 $\alpha$ -hidroxipregmolona para dihidroepiandrosterona e de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona para androtestenidiona, os quais são precursores de testosterona e de andrógenos (WESTON et al., 1998; HELZLSOUER et al., 1998). Nas glândulas adrenais, a 17 $\alpha$ -hidroxipregmolona

juntamente com 17OH progesterona é utilizada para a síntese de glicocorticóides (NAKAJIN et al., 1984).

Para este gene, tem-se descrito três polimorfismos: uma substituição C→T no nucleotídeo 5471 do éxon 6 (CROCITTO et al., 1997); uma substituição G→A no nucleotídeo 47 na extremidade 5´da região promotora não traduzida (CAREY et al., 1994); e finalmente uma substituição T→C no nucleotídeo 27 na extremidade 5´da região promotora não traduzida, a qual cria um sítio de restrição para a enzima *MspA1* (KRISTENSEN et al., 1999), resultando em três genótipos diferentes: um selvagem A1/A1, um heterozigoto A1/A2 e um mutante A2/A2. Somente este último polimorfismo será abordado neste estudo.

### 1.3 Polimorfismo *CYP17MspA1* e o risco de Câncer de mama

O risco de câncer de mama está relacionado a fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida assim como também a níveis de exposição a estrogênios e a outros hormônios sexuais (FEIGELSON e HENDERSON, 1996). Levando em consideração os fatores genéticos, genes com alta penetrância como o *BRCA1* e *BRCA2* estão associados com alguns casos familiares de câncer de mama, apesar desta associação ser significativa apenas para 5% de todos os casos deste tipo de câncer (BENETTE, GATTAS e TEH, 1999). Por outro lado, genes como o *CYP17*, juntamente com fatores endógenos e de estilo de vida, apresentam probabilidade mais alta de estarem relacionados com uma maior proporção de casos de câncer de mama (JOHNSON-THOMPSON e GUTHRIE, 2000). Fatores reprodutivos tais como idade tardia da primeira gravidez, nuliparidade, idade precoce da menarca e tardia da menopausa são considerados marcadores do tempo de exposição aos estrogênios (FEIGELSON e HENDERSON, 1996).

De acordo com alguns estudos, um aumento ou um decréscimo da atividade de enzimas envolvidas na síntese de estrogênio, como a Citocromo P450c17 $\alpha$ , pode alterar os níveis de estrôgenio endógeno (estradiol),

influenciando assim na susceptibilidade ao câncer (DUNNING et al., 1999; YE e PARRY, 2002).

O impacto do polimorfismo genético de *CYP17* em relação ao câncer de mama ganhou mais atenção depois que FEIGELSON et al. (1997), relataram um aumento do câncer de mama avançado em portadores do alelo A2. Este estudo concluiu que mulheres, em pré e pós-menopausa, portadoras do alelo variante A2 apresentam níveis mais altos de estrogênio circulante do que aquelas com alelos normais. Segundo o mesmo grupo, mulheres homozigotas A2 apresentam menor necessidade de reposição hormonal, provavelmente devido à ausência de sintomas de menopausa por causa da alta taxa de estrogênio circulante (FEIGELSON et al., 1998 e 1999). Alguns autores descreveram que mulheres em pré-menopausa, com o alelo A2, apresentam altos níveis de sulfato dehidroepiandrosterona, precursor de estrogênios e androgênios (HONG et al., 2004). No entanto, muitos estudos recentes não têm encontrado uma relação direta entre o risco para o câncer e o genótipo A2/A2 (THOMPSON e AMBROSONE, 2000; AMBROSONE et al., 2003).

Apesar de ter sido hipotetizado que o polimorfismo A2 fornecesse um sítio adicional de ligação para Sp-1, fator transcricional de inúmeros genes celulares, possibilitando um mecanismo para alta expressão deste variante alélico (FEIGELSON et al., 1997; 1998), esta hipótese não foi comprovada em experimentos práticos (KRISTENSEN et al., 1999).

Uma revisão sistemática de estudos sobre o gene *CYP17* e sua relação com o câncer de mama, reportou que o risco para a doença não é significativamente alterado pelos polimorfismos deste gene (DUNNING et al., 1999). Uma meta-análise de 15 estudos casos-controles publicados entre 1994 e 2001 mostrou que o polimorfismo *CYP17MspA1* pode ter um efeito pequeno no risco de câncer de mama, porém não constitui um fator significante independente (YE e PARRY, 2002).

Portanto, muitos autores acreditam que o polimorfismo *CYP17MspA1* não apresenta isoladamente um efeito no aumento do risco de câncer de mama. No

entanto, parece modificar as associações entre fatores hormonais e reprodutivos, os quais apresentam relação com a doença (HAIMAN et al., 1999).

Um estudo desenvolvido por AMBROSONE et al. (2003), reportou que os fatores hormonais e reprodutivos parecem variar de acordo com o genótipo *CYP17*. Mulheres com pelo menos um alelo A2 estariam mais sujeitas a terem menarca mais jovens do que mulheres com genótipo A1/A1. Menopausa mais tardia foi encontrada tanto para genótipos A1/A2 quanto para genótipos A2/A2. Mulheres com alelo A2, por apresentarem taxas mais altas de estrogênio circulante tanto na pré quanto na pós-menopausa, apresentam alta fertilidade e menarca mais precoce e menopausa mais tardia.

Com relação aos riscos para o desenvolvimento de câncer, o mesmo estudo concluiu que para mulheres em pré-menopausa a idade de menarca avançada foi significativamente protetora entre mulheres com alelos A1/A1. A idade tardia da primeira gravidez aumenta o risco entre mulheres pré-menopausa com A1/A1. O risco é ainda mais elevado para portadores A1/A1 que afirmam tomar contraceptivos orais ou terem dificuldades de engravidar. Para mulheres em pós-menopausa, aquelas com alelos A2 e que tinham tido a primeira gravidez tardia e com dificuldade de engravidar, apresentam maior risco de câncer. (AMBROSONE et al., 2003).

Portanto, os hormônios esteróides apresentam um importante papel na etiologia do câncer de mama. A identificação de risco associado com diferenças genéticas nas vias de biossíntese e de metabolismo destes hormônios podem auxiliar na prevenção, terapia e prognóstico do câncer de mama.

## 2. OBJETIVOS

- Comparar as frequências alélicas e genóticas entre pacientes com câncer mamário e controles para o polimorfismo *CYP17MspA1*, em mulheres caucasóides tanto em período de pré quanto de pós menopausa.
- Comparar as frequências alélicas e genóticas entre pacientes com câncer mamário e controles para o polimorfismo *CYP17MspA1*
- Comparar os resultados obtidos com dados já existentes na literatura.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com amostras de sangue periférico de 41 pacientes do sexo feminino portadoras de carcinomas mamários e de 35 mulheres sem evidências de câncer, pareadas pelo sexo, etnia e faixa etária ( $\pm 5$  anos). A média de idade das pacientes foi de  $62,02 \pm 13,02$  e dos controles de  $64,08 \pm 12,10$  ( $t=0,733$ ;  $P>0,40$ ).

O material das pacientes foi proveniente do Hospital Nossa Senhora das Graças e o dos controles da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e de mulheres que foram contatadas e voluntariamente decidiram participar do estudo. Foi estabelecido um contato pessoal com cada doador que recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Informado, para posterior coleta do material. Todas as participantes foram entrevistadas com um questionário, constante no apêndice I. O consentimento informado está constante no apêndice II. Através dos questionários, se obteve informações com relação ao histórico reprodutivo, tais como: menarca, menopausa, número de filhos, abortos espontâneos, idade da primeira gravidez e uso de contraceptivos orais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba, PR.

#### 3.1 Coletas do sangue e armazenamento das amostras

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

### 3.2 Processamento do Sangue

As amostras contendo sangue periférico das pacientes e dos respectivos controles foram lisadas em um processo onde as células vermelhas e brancas do sangue são separadas, através de centrifugações a 2.000 rpm por 10 minutos e utilizando-se a solução RCLB (1x). Após a separação completa, foi adicionado à amostra, livre de hemácias, 3 gotas de solução PBS, e em seguida esta foi novamente centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos.

### 3.3 Extrações do DNA Genômico

Para a extração foi utilizado o método de *salting out* que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol. Para cada amostra, foi lida a densidade ótica (D.O.), com a utilização de um espectrofotômetro.

### 3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise dos produtos

A técnica de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) foi utilizada para a detecção do polimorfismo do gene *CYP17*. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores, já estando padronizadas as respectivas condições de amplificação e análise dos produtos.

Para a análise do polimorfismo *CYP17*MSPA1 utilizou-se os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: CYP-1, 5'-CATTCGCACTCTGGAGTC-3' e CYP-2, 5'-AGGCTCTTGGGGTACTTG-3'. As reações de PCR foram feitas com base no protocolo de MCKEAN-COWDIN et al. (2001), nas seguintes condições:

- Volume final de reação: 25 µl

- 50ng de DNA genômico,
- 50pmol de cada iniciador
- 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>
- tampão de reação 1X
- 100μM de desoxinucleotídeos trifosfatados
- 1U da enzima Taq DNA polimerase.

Para a reação de amplificação, foi utilizado o termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient, programado com as seguintes condições:

- Um ciclo de desnaturação inicial a 94° C por um período de 5 minutos
- 30 ciclos contendo desnaturação a 94° C por 5 minutos, anelamento de iniciadores a 57° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 5 minutos.
- Um ciclo final de extensão a 72° C por 5 minutos.

A digestão enzimática foi realizada com a utilização da enzima de restrição *MspA1* foi realizada com base no seguinte protocolo:

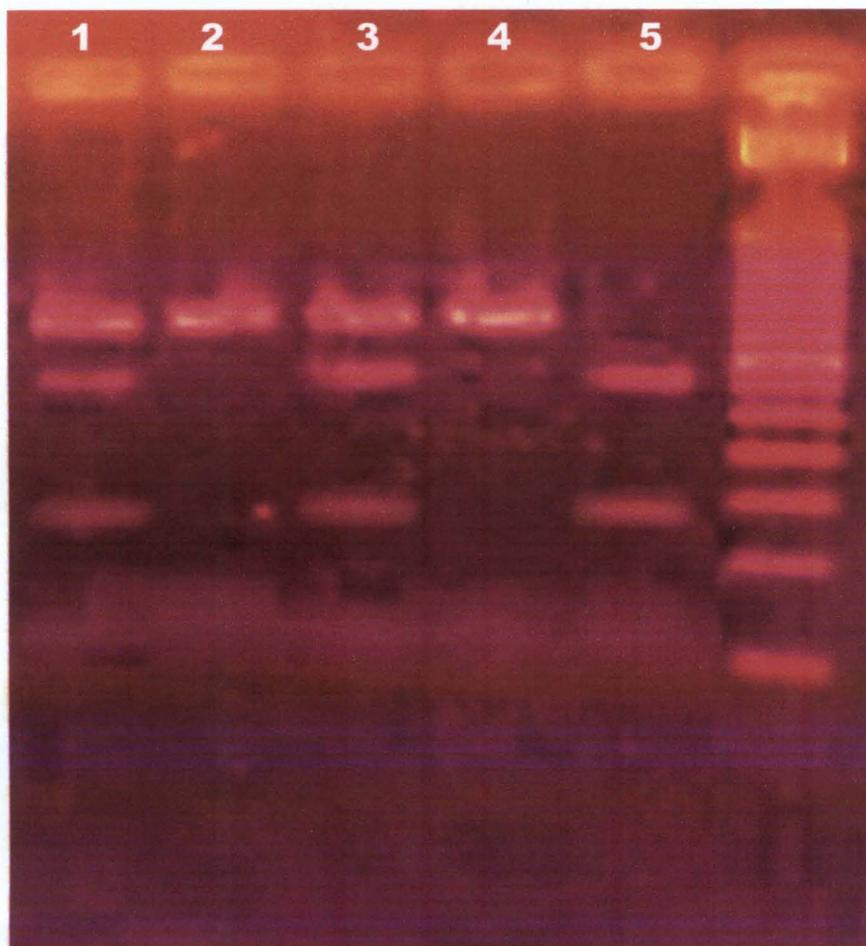
- volume de reação: 20 μl
- 2U da Enzima de restrição *MspA1*
- 2U de BSA da mesma enzima
- tampão de reação 1X

Os produtos da reação de PCR foram digeridos por 3 horas a 37° C. A análise do polimorfismo foi feita após eletroforese em cuba contendo tampão TBE 1X, diluído da solução estoque 10X concentrada (121,1 g de Tris; 61,83 g de Ácido Bórico; 40 ml de EDTA 0,5 M e água ultra-pura para completar o volume final de 1000 ml). As reações foram visualizadas em gel de agarose 1,8%, corado com brometo de etídeo (10mg/ml).

Os produtos de amplificação observados foram de: um fragmento de 383 pb, correspondente ao genótipo homozigoto selvagem A1/A1; uma banda em 248 e outra em 135 pb, correspondendo ao genótipo homozigoto mutante A2/A2; e três bandas em 383, 248 e 135 pb, representando o genótipo heterozigoto (figura 1).

Para identificação do peso molecular de cada amostra foi utilizado um

marcador de 50 pb diluído (10  $\mu$ l de marcador de DNA, 10  $\mu$ l de ficol e 80  $\mu$ l de água ultra-pura). Os géis foram analisados em transluminador de luz ultra-violeta e documentados em sistema de captação de imagens pelo software "Digi Doc It".

**Figura 01**

Gel de agarose a 3% representando os genótipos do polimorfismo analisado. Números 1 e 3 representam o genótipo heterozigoto (A1/A2); os números 2 e 4 representam o genótipo homozigoto selvagem (A1/A1); e o número 5 representa o genótipo homozigoto mutante (A2/A2).

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados, foram utilizados os seguintes testes: a avaliação do risco relativo (OR), com o objetivo de verificar uma possível associação entre os genótipos em estudo e o risco de desenvolver câncer de mama; Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para avaliar a significância das diferenças das frequências genotípicas obtidas nos pacientes e nos controles, o envolvimento dos linfonodos regionais, o grau histológico (estes dois últimos nos pacientes A1/A1 X A1/A2+A2/A2) e para comparar os nossos dados com os da literatura; Student ( $t$ ), para avaliar a significância das diferenças entre as médias observadas nos pacientes e nos controles, obtidas nos seguintes parâmetros clínicos: idade da menarca, idade da menopausa, idade da 1ª gravidez, e tempo de uso de pílulas anticoncepcionais e tempo de exposição ao estrogênio e o tamanho do tumor (nos pacientes com genótipos A1/A1 X A1/A2+A2/A2). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado quanto às distribuições genotípicas nos pacientes e nos controles através do teste do Qui-quadrado.

## 5. RESULTADOS

As amostras foram constituídas por 41 pacientes com carcinomas mamários e 35 controles sem evidências de tumores mamários.

Entre os pacientes, 19 (46,3%) apresentaram genótipo homocigoto selvagem A1/A1; 21 (51,2%) o genótipo heterocigoto A1/A2 e 1 (2,4%) o genótipo homocigoto mutante (A2/A2). Entre os controles, 18 (51,4%) apresentaram genótipo A1/A1; 16 (45,71%) o genótipo A1/A2 e 1 (2,9%) o genótipo mutante A2/A2, sendo que os mesmos apresentaram-se homogeneamente distribuídos nos pacientes e nos controles ( $\chi^2_2=0,23$ ;  $P>0,80$ ). As frequências do alelo dominante foram iguais a 0,72 e 0,74 e as do alelo recessivo foram iguais a 0,28 e 0,26, respectivamente nos pacientes e nos controles. Ambas as amostras foram obtidas em populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2_1=3,12$ ;  $P>0,05$  e  $\chi^2_1=1,35$ ;  $P>0,20$ , respectivamente para pacientes e controles).

As associações entre os genótipos e o desenvolvimento de câncer foram analisadas a partir do teste de risco relativo (OR), obtendo-se o valor de: OR = 0,82; IC=0,33-2,01.

A Tabela 1 apresenta as informações sobre as pacientes com relação ao tipo e grau histológico, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos regionais e os respectivos genótipos.

A partir dos questionários utilizados nas entrevistas, obtivemos as seguintes informações: entre os pacientes a idade média de menarca foi de  $12,81 \pm 1,56$  e da menopausa de  $48,07 \pm 6,67$  anos. A idade média da primeira gravidez foi de  $24,24 \pm 4,87$  anos. Em relação ao consumo de pílulas anticoncepcionais, 19 mulheres afirmaram já terem utilizado, 18 declararam nunca terem feito uso de contraceptivos orais e 4 pacientes não souberam responder a esta questão. O tempo médio de exposição ao estrogênio, isto é, o tempo entre a menarca e a menopausa foi de  $35,12 \pm 6,55$  anos.

Entre os controles, a idade média da menarca foi de  $13,28 \pm 1,35$  e da menopausa de  $49,57 \pm 5,95$  anos. A idade média da primeira gravidez foi de  $21,65$

$\pm 3,11$  anos. Com relação ao uso de contraceptivos orais, 10 mulheres afirmaram já terem utilizado pílulas anticoncepcionais, 24 declararam nunca terem consumido e 2 não souberam responder a esta questão. O tempo médio de exposição ao estrogênio foi de  $36,43 \pm 5,58$  anos.

Os genótipos dos pacientes foram classificados em dois grupos de acordo com ausência (A1/A1) e presença (A1/A2+ A2/A2) do alelo considerado de risco de desenvolver câncer mamário. Esta classificação teve como objetivo investigar possíveis diferenças entre a gravidade do tumor, de acordo com a classificação histológica (graus I, II e III), tamanho do tumor e envolvimento de linfonodos regionais. Com relação ao grau do tumor, as pacientes de números 20 e 30 foram consideradas tanto no grupo de grau II quanto no de grau III, pois histologicamente os tumores apresentavam áreas distintas com diferentes graus. Não houve diferença significativa entre os diferentes genótipos ( $\chi^2_2=0,63$ ;  $P>0,30$ ). O mesmo foi observado quanto ao tamanho médio ( $35,26 \pm 16,55$  para A1/A1 e  $35,33 \pm 14,01$  para A1/A2+A2/A2) dos tumores ( $t=0,01$ ;  $P>0,90$ ). No entanto, o número de pacientes com envolvimento ou não de linfonodos não se apresentou homogeneamente distribuído entre os genótipos considerados ( $\chi^2_1= 4,82$ ;  $P<0,05$ ) e a análise de associação indicou uma associação negativa (OR=0,23, IC 95% - 0,06-0,88).

A presença ou ausência do polimorfismo *CYP17 Msp1A1* foi correlacionada a fatores de riscos hormonais e sexuais, calculando-se o teste *t* para cada um destes fatores. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

Comparações das frequências genotípicas encontradas neste estudo foram comparadas com outras descritas na literatura e estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 1. Informações sobre tipo, grau histológico, tamanho do tumor e envolvimento de linfonodos, nos genótipos A1/A1; A1/A2 e A2/A2.**

<b>N</b>	<b>Idade</b>	<b>Tipo de tumor</b>	<b>Grau</b>	<b>Tamanho (mm)</b>	<b>Envolvimento de linfonodos</b>	<b>Genótipos</b>
1	77	Ca intra-ductal	II	70	Sim	A1/A1
2	80	Ca ductal	I	7	Não	A1/A2
3	68	Ca ductal invasor	II	20	Sim	A1/A1
4	66	Ca ductal invasor	II	8	Sim	A1/A1
5	62	Ca ductal	II	25	Não	A1/A1
6	53	Ca ductal invasor	II	15	Sim	A1/A1
7	69	Ca ductal invasor	II	47	Não	A1/A2
8	72	Ca ductal invasor	III	40	Não	A1/A1
9	69	Ca lobular invasor	S.I	50	Não	A1/A2
10	68	Ca ductal invasor	II	60	Sim	A1/A1
11	68	Ca ductal invasor	II	40	Não	A1/A2
12	37	Ca intraductal	I	35	Não	A2/A2
13	87	Ca ductal invasor	II	55	Sim	A1/A2
14	53	Ca ductal invasor	II	30	Não	A1/A2
15	44	Ca ductal invasor	III	40	Não	A1/A1
16	73	Ca ductal	II	35	Sim	A1/A1
17	86	Ca ductal invasor	II	30	Não	A1/A2
18	72	Ca lobular invasor	S.I	50	Não	A1/A2
19	63	Ca ductal invasor	II	40	Não	A1/A1
20	43	Ca ductal invasor	IleIII	30	Não	A1/A2

continua

N	Idade	Tipo de tumor	Grau	Tamanho (mm)	Envolvimento de linfonodos	Genótipos
21	68	Ca colóide associado à ductal invasor	I	45	Sim	A1/A2
22	60	Ca ductal	I	40	Não	A1/A2
23	44	Ca lobular invasor	II	55	Não	A1/A2
24	83	Ca ductal invasor	II	40	Sim	A1/A1
25	57	Ca intraductal	III	35	Não	A1/A1
26	75	Ca ductal invasor	III	25	Não	A1/A1
27	63	Ca ductal invasor	III	40	Sim	A1/A2
28	66	Ca ductal	I	50	Sim	A1/A1
29	46	Ca ductal	II	28	Sim	A1/A2
30	59	Ca ductal invasor	IleIII	30	Sim	A1/A1
31	53	Ca ductal invasor	II	35	Não	A1/A2
32	46	Ca lobular invasor	II	60	Sim	A1/A1
33	69	Ca ductal	I	12	Não	A1/A1
34	67	Ca ductal invasor	II	30	Não	A1/A2
35	68	Ca ductal invasor	II	15	Não	A1/A2
36	51	Ca ductal invasor	III	15	Não	A1/A2
37	45	Ca ductal	II	50	Sim	A1/A2
38	42	Ca ductal invasor	S.I	15	Não	A1/A2
39	56	Ca ductal	II	30	Sim	A1/A1
40	44	S.I	S.I	S.I	S.I	A1/A2
41	72	Ca ductal invasor	I	35	Não	A1/A1

Ca: carcinoma; S.I.: sem informações

Tabela 2. Médias dos parâmetros clínicos relacionados aos diferentes genótipos

FATORES	A1/A1		A1/A2 e A2/A2	
	P	C	P	C
Idade da Menarca	12,72± 1,32 n=18	13,06± 1,43 n=18	13,00± 1,78 n=18	13,57± 1,22 n=14
	t= 0,74 P>0,40	t= 0,74 P>0,40	t= 1,02 P>0,30	t= 1,02 P>0,30
Idade da Menopausa	48,77± 5,08 n=18	50,22± 6,38 n=18	47,45± 7,91 n=20	48,54± 4,94 n=11
	t= 0,75 P>0,40	t= 0,75 P>0,40	t= 0,41 P>0,60	t= 0,41 P>0,60
Idade da primeira gestação	23,68± 4,38 n=16	22,0± 3,46 n=12	24,92± 5,60 n=13	21,09± 3,08 n=11
	t= 1,12 P>0,20	t= 1,12 P>0,20	t= 2,02 P>0,05	t= 2,02 P>0,05
Tempo de uso de contraceptivo oral	10,57± 7,36 n=7	11,0± 11,76 n=5	11,87± 7,18 n=12	5,06± 8,41 n=5
	t= 0,08 P>0,90	t= 0,08 P>0,90	t= 1,71 P>0,10	t= 1,71 P>0,10
Tempo médio de exposição ao estrogênio	35,88± 4,59 n=17	37,16± 6,16 n=18	34,23± 7,98 n=17	35,27± 4,86 n=11
	t= 0,710 P>0,50	t= 0,710 P>0,50	t= 0,39 P>0,70	t= 0,39 P>0,70

P= paciente; C= controle

**Tabela 3.** Frequências dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 em pacientes descritos em dois estudos casos-controles (A, B) e na presente amostra (C).

Genótipos	Amostras					
	A		B		C	
	N	%	N	%	N	%
<b>A1/A1</b>	178	38,4	550	36,7	19	46,3
<b>A1/A2</b>	212	45,8	711	47,4	21	51,2
<b>A2/A2</b>	73	15,8	238	15,9	1	2,4

A: HAIMAN, et al., 2001; B: EINARSDÓTTIR et al., 2005; C: presente estudo. N=número de indivíduos.

**Tabela 4.** Frequências dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 em controles descritos em três estudos casos-controles (A, B, C) e na presente amostra (D).

Genótipos	Amostras							
	A		B		C		D	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>A1/A1</b>	217	35,1	267	39,3	488	36,5	18	51,4
<b>A1/A2</b>	307	49,7	317	46,7	638	47,6	16	45,7
<b>A2/A2</b>	94	15,2	95	14,0	212	15,9	1	2,86

A: HAIMAN, et al 1999; B: CHANG et al, 2005; C: EINARSDÓTTIR et al., 2005; D: presente estudo. N= número de indivíduos.

## 6. DISCUSSÃO

A associação entre o tempo de exposição a hormônios sexuais endógenos e exógenos e o aumento do risco de câncer de mama é bem estabelecida (CHANG et al., 2005). Polimorfismos em genes da via de metabolização dos hormônios endógenos podem ser úteis como marcadores de susceptibilidade, contribuindo para um melhor conhecimento sobre a predisposição individual ou de grupos populacionais ao câncer. O gene *CYP17* é um bom candidato a marcador molecular por estar envolvido na via metabólica de síntese de hormônios esteróides.

Neste estudo, as amostras foram constituídas por 41 mulheres com diagnóstico de carcinoma mamário esporádico e 35 controles sem história familiar ou evidências de carcinomas. As frequências genótípicas foram de 46,5% pacientes homozigotos selvagens A1/A1; 51,2% heterozigotos A1/A2 e 2,4 % mutantes A2/A2. Entre os controles, 51,4% apresentaram genótipo A1/A1; 45,7% o genótipo A1/A2 e 2,9% o genótipo mutante A2/A2. Não houve diferença significativa nas distribuições genótípicas entre pacientes e controles ( $\chi^2_2 = 0,23$ ,  $P > 0,80$ ). A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg demonstrou que as amostras foram retiradas de uma população em equilíbrio ( $\chi^2_1 = 3,12$ ;  $P > 0,05$  e  $\chi^2_1 = 1,35$ ;  $P > 0,20$  para pacientes e controles, respectivamente) A análise do risco relativo mostrou ausência de associação, positiva ou negativa (OR=0,82; IC=0,33-2,01).

Estes resultados estão de acordo com dados de outros estudos, citados a seguir. DUNNING et al. (1998), realizaram um estudo caso-controle envolvendo grande número de indivíduos ingleses (835 casos e 591 controles) e não encontraram associação com o risco de câncer de mama (OR=1,10; IC 95%=0,89-1,37) ou com a presença de câncer mamário em grau avançado (OR=0,88; IC 95%=0,38-2,01) nos portadores do alelo mutante, nem associação entre o genótipo e idade da menarca. HAIMAN et al. (1999), analisando 463 portadoras de câncer de mama e 618 controles, não encontraram associação entre a presença do alelo A2 e o risco de câncer (OR=0,85; IC 95%=0,65-1,12) ou com a presença desta doença em grau avançado (OR=0,84; IC 95%=0,54-1,32). Entre os vários fatores de risco analisados, estes autores descreveram um efeito

protetor do alelo A1 em mulheres com idade tardia da menarca e um maior nível hormonal entre os controles portadores do alelo A2, sugerindo que a presença do alelo A2 altera os níveis hormonais, mas não demonstra ser um fator independente de risco. VERLA-TEBIT et al. (2005), avaliaram o impacto dos diferentes genótipos do *CYP17* em mulheres em pré-menopausa, com ênfase na paridade. Avaliaram 527 casos e 904 controles, todos abaixo dos 51 anos de idade. Não encontraram associação quanto ao risco de câncer (OR=1,04; IC 95%=0,78-1,37), mas descrevem um possível impacto em mulheres nulíparas portadoras do genótipo A2/A2 (OR=1,48; IC 95%=0,82-2,70). CHANG et al. (2005) também não descreveram associações analisando uma amostra da população australiana composta de 1284 casos e 679 controles. A OR para as portadoras do genótipo A2/A2 foi de 1,08; IC 95%=0,78-1,51.

Outros autores, porém, descreveram associações entre a presença do alelo mutante e o risco do câncer de mama, o que tem estimulado a continuidade deste tipo de análise para uma melhor avaliação do possível impacto desta mutação.

Em trabalho publicado em 1998, FEIGELSON e colaboradores descreveram que mulheres portadoras do alelo A2, por terem um maior nível hormonal circulante, teriam um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. No entanto, o mesmo grupo (FEIGELSON et al., 1999) descreveu que as portadoras do alelo A2, eram usuárias de terapia de reposição hormonal em nível estatisticamente menor em relação às mulheres com genótipo A1/A1, fato que poderia diminuir o risco ao câncer de mama nas pacientes com a presença do alelo A2. Para corroborar esta hipótese, realizaram estudo de associação (FEIGELSON et al., 2001) envolvendo 850 pacientes e 1508 controles. Neste estudo, dois genes polimórficos envolvidos no metabolismo do estrogênio foram analisados, *CYP17* e *HSD17B1*. A análise estatística foi realizada estratificando a amostra de acordo com o número de alelos de risco (A2 e B1, respectivamente). O risco relativo para as mulheres portadoras de quatro alelos mutantes, em relação àquelas sem nenhum destes foi de 2,21; IC 95%=0,98–5,0, sugerindo a relevância de análises genótípicas para a identificação de mulheres em grupos de risco.

BERGMAN-JUNGESTROM et al. (1999) também descreveram associação positiva entre este polimorfismo e o risco de câncer de mama em mulheres abaixo dos 37 anos de idade (OR=2,0; IC 95%=1,1-3,5).

Observa-se que, apesar da semelhança nos objetivos dos trabalhos descritos (avaliar associação entre genótipos de risco e a presença de câncer), há grandes diferenças em relação aos fatores analisados como “de risco” (idade, paridade, níveis hormonais, etc.), o que poderia explicar as divergências de resultados.

Ainda em relação à distribuição dos genótipos, comparamos os nossos dados com os de outros estudos semelhantes (Tabelas 3 e 4), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diversos estudos ( $\chi^2_4 = 6,24$ ,  $P > 0,10$  para os pacientes e  $\chi^2_6 = 8,78$ ,  $P > 0,10$  para os controles).

Para avaliarmos o impacto da presença do alelo de risco (A2), comparamos os indivíduos heterozigotos (A1/A2) e homozigotos mutantes (A2/A2) em conjunto, com os homozigotos selvagens (A1/A1), considerando os fatores hormonais e sexuais de risco como menarca, menopausa, idade da primeira gravidez, uso prolongado de pílulas anticoncepcionais e tempo de exposição ao estrogênio.

As médias das variáveis citadas, de pacientes e controles, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2).

Estes resultados indicam que, neste estudo, os indivíduos portadores do alelo A2, não apresentaram um aumento do risco de câncer de mama quando foram analisados os fatores acima descritos. Porém o pequeno tamanho da amostra pode ter mascarado algumas possíveis associações, as quais foram descritas por outros estudos com números amostrais maiores como AMBROSONE et al. (2003) e CHANG et al. (2005).

Entre os pacientes, foi também realizada uma análise com relação ao grau histológico do tumor (I, II ou III), tamanho do mesmo e envolvimento ou não de linfonodos regionais. O grau histológico do tumor não diferiu significativamente entre pacientes com genótipo A1/A1 e os com genótipos de risco A1/A2 e A2/A2 ( $\chi^2_2 = 0,63$ ;  $P > 0,30$ ), assim como a média de tamanho dos tumores ( $t = 0,01$ ;  $P > 0,90$ ), indicando que na nossa amostra os genótipos analisados não influenciaram na gravidade do quadro clínico, o que também foi descrito em outro

estudo (HAIMAN et al., 1999) sugerindo que o alelo A2 não esteja envolvido no aumento do risco de progressão de câncer de mama. Como já citado anteriormente, estes dados não estão de acordo com BERGMAN-JUNGSTROM et al. (1999) e FEIGELSON et al. (2001).

A análise de envolvimento de linfonodos regionais indicou uma diferença significativa não esperada, sendo que os indivíduos A1/A1 apresentaram um maior envolvimento de linfonodos do que aqueles com o genótipo de risco ( $\chi^2_1=4,82$ ;  $P<0,05$ ). Este dado não está de acordo com os dados de HAIMAN et al. (1999). A análise de associação demonstrou associação negativa (OR=0,23; IC 95%= 0,06-0,88). Novamente temos que considerar o baixo número amostral do nosso estudo como uma possível causa para este resultado, porém chama a atenção para que outros estudos avaliem este item com cautela, com o objetivo de diferenciar se houve uma associação espúria ou se representa um efeito protetor do alelo A2 em relação às metástases regionais.

## 7. CONCLUSÕES

Os nossos dados não demonstram associação positiva ou negativa entre os diferentes genótipos analisados do gene *CYP17* e risco de desenvolver câncer mamário. Também não se observa diferenças significativas entre os diferentes parâmetros clínicos (idade da menarca, idade da menopausa, idade da primeira gestação, tempo médio de uso de contraceptivos orais e tempo médio de exposição ao estrogênio) analisados nos pacientes e nos controles. Nos pacientes, não houve diferença estatisticamente significativa quando se analisou os diferentes genótipos (A1/A1; A1/A2+A2/A2) em relação ao tipo, grau e tamanho do tumor (parâmetros indicativos de gravidade do quadro). O achado de que o envolvimento de linfonodos não se mostrou homoganeamente distribuído nos referidos genótipos e mostrou associação negativa, é devido, provavelmente, ao tamanho da amostra. No entanto, o mesmo deve ser avaliado em amostras de tamanhos mais consistentes para uma definição mais conclusiva. A frequência dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 observadas nos nossos dados (pacientes e controles) não mostrou diferenças estatisticamente significativas com as descritas por outros autores.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSONE, C.B.; MOYSICH, K.B.; FURBERG, H.; FREUDENHEIM, J. L.; BOWMAN, E.D.; AHMED, S.; GRAHAM, S.; VENA, J.E.; SHIELDS, P.G. CYP17 genetic polymorphism, breast cancer and breast cancer risk factors. **Breast Cancer Res.** 5:45-51, 2003.
- BENNETT, I.C.; GATTAS, M.; TEH, B.T. The genetic basis of breast cancer and its clinical implications. **Aust N Z J Surg.** 69:95-105, 1999.
- BERGMAN-JUNGESTROM M., GENTILE M., LUNDIN A.C. and the SouthEast Breast Cancer Group. Association between CYP17 gene polymorphism and risk of breast cancer in young women. **Int J Cancer.** 84:350–353, 1999.
- CAREY, A.H.; WATERWORTH, D.; PATEL, K.; WHITE, D.; LITTLE, J.; NOVELL P.; FRANKS, S.; WILLIAMSON, R. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. **Human Mol Genet.** 3:1873–1876, 1994
- CHANG, J.H.; GERTIG, D.M.; CHEN, X.; DITE, G.S.; JENKINS, M.A; MILNE, R.L.; SOUTHEY, M.C.; MCCREDIE, M.R.; GILES, G.G.; CHENEVIX-TRENCH, G.; HOPPER, J.L.; SPURDLE, A.B. CYP17 genetic polymorphism, breast cancer, and breast cancer risk factors: Australian Breast Cancer Family Study. **Breast Cancer Res.** 7(4): 513–521, 2005.
- CONFORTI-FROES, N.D.T.; ROSSIT, A. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. **RSBC - Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia.** 10: 26-31, 2000.
- CROCITTO, L.E.; FEIGELSON, H.S.; YU, M.C.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E.; COETZEE, G.A. A polymorphism in intron 6 of the CYP17 gene. **Clin Genet.** 52:68–69, 1997.
- DUNNING, A.M.; HEALEY C.S.; PHAROAH, P.D.; FOSTER, N.A.; LIPSCOMBE, J.M.; EASTON, D.F.; DAY, N.E.; PONDER, B.A.: No association between a polymorphism in the steroid metabolism gene CYP17 and the risk of breast cancer. **Br J Cancer.** 77(11): 2045-2047, 1998.
- DUNNING, A. M.; HEALEY, C.S.; PHARAOH, P.D.P.; TEARE, M.D.; PONDER, B.A.; EASTON, D.F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 8:843–854, 1999.
- FEIGELSON, H.S.; HENDERSON, B.E. Estrogens and breast cancer. **Carcinogenesis.** 17:2279-2284, 1996.

FEIGELSON H.S., COETZEE, G.A., KOLONEL, L.N.; ROSS, R.K., HENDERSON, B.E. A polymorphism in the *CYP17* gene increases the risk of breast cancer. **Cancer Res.**57:1063–1065, 1997.

FEIGELSON, H.S.; SHAMES, L.S.; PIKE, M.C.; COETZEE, G.A.; STANCYZ, F.Z.; HENDERSON, B.E. Cytochrome P450c17alpha gene (*CYP17*) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. **Cancer Res.**58:585–587, 1998.

FEIGELSON, H.S.; MCKEAN-COWDIN, R.; PIKE, M.C.; COETZEE, G.A.; KOLONEL, L.N.; NOMURA, A.M.Y.; LEMARCHAND, L.; HENDERSEN, B.E. Cytochrome P450c17 $\alpha$  gene (*CYP17*) polymorphism predicts use of hormone replacement therapy. **Cancer Res.**59:3908–3910, 1999.

FEIGELSON, H.S.; MCKEAN-COWDIN, R.; COETZEE, G.A.; STRAM, D.O.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E. Building a Multigenic Model of Breast Cancer Susceptibility: *CYP17* and *HSD17B1* Are Two Important Candidates. **Cancer Research.** 61, 785-789, January 15, 2001.

HAIMAN, C.A.; HANKINSON, S.E.; SPIEGELMAN, D.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C.; SPEIZER, F.E.; KELSEY, K.T.; HUNTER, D.J. The Relationship between a Polymorphism in *CYP17* with Plasma Hormone Levels and Breast Cancer. **Cancer Research.** 59, 1015-1020, March 1, 1999.

HANKINSON, S. E.; WILLETT, W. C.; MANSON, J. E.; COLDITZ, G. A.; HUNTER, D. J.; SPIEGELMAN, D.; BARBIERI, R. L.; SPEIZER, F. E. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. **J. Natl. Cancer Inst.** 90: 1292-1299, 1998.

HELZLSOUER, K.J.; HUANG, H.Y.; STRICKLAND, P.T.; HOFFMAN, S.; ALBERG, A.J.; COMSTOCK, G.W.; BELL, D.A. Association between *CYP17* polymorphisms and the development of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**7:945–949, 1998.

HONG, C.C.; THOMPSON, H.J.; JIANG, C.; HAMMOND, G.L.; TRITCHLER, D.; YAFFE, M.; BOYD, N.F. Association between the T27C polymorphism in the cytochrome *P450 c17 $\alpha$*  (*CYP17*) gene and risk factors for breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 88:217-230, 2004.

INCA: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, 2005. [www.inca.gov.br/estimativa/2005/conteudo\\_view.asp?id=1](http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/conteudo_view.asp?id=1)  
Acessado em 5 de agosto de 2005.

JOHNSON-THOMPSON, M.C.; GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer.** 88:1224-1229, 2000.

KRISTENSEN, V.N.; HARALDSEN, E.K.; ANDERSON, K.B.; LONNING, P.E.; ERIKSTEIN, B.; KARENSEN, R.; GABRIELSEN, O.S.; BORRESEN-DALE, A.L. *CYP17* and breast cancer risk: the polymorphism in the 5' flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. **Cancer Res.** 59:2825–2828, 1999.

McKEAN-COWDIN, R.; FEILGELSON, H.S.; PIKE, M.C.; COETZEE, A.G.; KOLONEL, L.N., HENDERSON, B.E. Risk of endometrial cancer and estrogen replacement therapy history by *CYP17* genotype. **Cancer Res.** 61: 848-849. 2001.

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

NAKAJIN, S.; SHINODA, M.; HANIU, M.; SHIVELY, J. E.; HALL, P. F. C21 steroid side chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsomes: purification and characterization of the 17 $\alpha$  hydroxylase/C17,20-lyase cytochrome P450. **J. Biol. Chem.** 259: 3971-3976, 1984.

PANDIS, N.; JIN, Y.; GORUNAVA, L.; PETERSSON, C.; BARDIG, G.; IDVALL, I.; JOHANSSON, B.; INVGAR, C.; MANDAHL, N.; MITELMAN, F. Chromosome analysis of 97 breast carcinomas. Identification of eight karyotypic subgroups. **Genes, Chrom. Cancer** .12: 173-185, 1995.

THOMAS, H. V.; KEY, T. J.; ALLEN, D. S.; MOORE, J. W.; DOWSETT, M.; FENTIMAN, I. S.; WANG, D. Y. A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in premenopausal women on the island of Guernsey. **Br. J. Cancer**, 75: 1075-1079, 1997.

THOMPSON, P.A.; AMBROSONE, C. Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in human breast cancer. **J Natl Cancer Inst Monographs**. 27:125-134, 2000.

WESTON, A.; PAN, C-F.; BLEIWEISS, I. J.; KSIESKI, H. B.; ROY, N.; MALONEY, N.; WOLF, M. S. *CYP17* genotype and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** 7: 941-945, 1998.

VERLA-TEBIT, E.; WANG-GOHRKE S.; CHANG-CLAUDE, J. *CYP17* 5'-UTR MspA1 polymorphism and the risk of premenopausal breast cancer in a German population-based case-control study. **Breast Cancer Research**. 7:R455-R464, 2005.

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

YE, Z.; PARRY, J.M. The *CYP17* MspA1 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. **Mutagenesis**. 17:119–126, 2002.

## APÊNDICE I- QUESTIONÁRIO PARA ENTREVISTAS

- 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 ( ) 1° grau incompleto ( ) 1° grau completo ( ) 2° grau incompleto  
 ( ) 2° grau completo ( ) técnico ( ) profissional ( ) superior

### 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 ?



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

## APÊNDICE II- TERMO DE CONSENTIMENTO

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

### CONSENTIMENTO

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

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

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

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

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

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli