

GIOVANA TARDIN TORREZAN



**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1* E
CYP17 EM CÂNCERES MAMÁRIOS ESPORÁDICOS**

**Monografia apresentada ao curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.**

**Orientadora: Prof. Dra. Enilze Maria de
Souza Fonseca Ribeiro**

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

CURITIBA

2006

GIOVANA TARDIN TORREZAN

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1* E
CYP17 EM CÂNCERES MAMÁRIOS ESPORÁDICOS**

**Monografia apresentada ao curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.**

**Orientadora: Prof. Dra. Enilze Maria de
Souza Fonseca Ribeiro**

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

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos meus pais, Irineu Braz Torrezan e Iracema Tardin Torrezan, pelo incentivo e apoio incondicional, pelas oportunidades, por todo o amor e carinho e por serem exemplos de coragem, honestidade e perseverança.

Ao meu irmão, Hugo Tardin Torrezan, e namorado Márcio Marques de Moraes, pela compreensão e paciência, pelo carinho e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus professores e orientadores, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e Iglénir João Cavalli, por todas as contribuições, oportunidades ensinamentos e confiança, por terem feito mais que ensinar e orientar, por fazerem do laboratório uma segunda casa para todos nós.

Às minhas amigas, Alana, Gabriela, Simone, Carem e Ana, pela amizade, carinho, e por terem se tornado minha família em Curitiba.

A todos os colegas do Laboratório de Citogenética Humana, especialmente à Márcia, Clarissa e Carol, pela participação neste trabalho, ao Marcos e Roberta, pelos ensinamentos e paciência e à Sarah, pelo companheirismo, auxílio e comunhão de idéias durante a realização deste trabalho.

Àqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho e não estão citados aqui.

Descobrir que o Universo tem cerca de 8 bilhões a 15 bilhões de anos, em vez de 6 a 12 mil anos, aumenta a nossa apreciação de sua extensão e grandiosidade; nutrir a noção de que somos uma combinação especialmente complexa de átomos, em vez de um sopro da divindade, pelo menos intensifica o nosso respeito pelos átomos...

Carl Sagan

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	v
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1. POLIMORFISMOS EM GENES DO BIOMETABOLISMO E CÂNCER	5
3.1.1. Genes da Família Citocromo P450 (CYPs)	5
3.1.2. Genes da Família Glutathione S-transferases (GSTs)	9
3.2. CARCINOMAS MAMÁRIOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	14
4.2. PROCEDIMENTOS	14
4.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DOS PRODUTOS	15
4.4. ANÁLISE DOS DADOS	20
5. RESULTADOS	22
5.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS	22
5.2. ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	23
5.3. ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO	25
5.4. PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS	28
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 – Variantes alélicas do gene <i>CYP2E1</i>	6
TABELA 2 – Fatores de Risco – Média de Pacientes e Controles	26
TABELA 3 – Média dos fatores de risco em mulheres com genótipo <i>GSTM1</i> -nulo	26
TABELA 4 – Média dos fatores de risco em mulheres com genótipo <i>GSTT1</i> -nulo	27
TABELA 5 – Média dos fatores de risco em mulheres com genótipo <i>CYP17-MspA1</i> A1/A2 e A2/A2	27
TABELA 6 – Média dos fatores de risco em pacientes com 3 genótipos selvagens e 2 genótipos de risco	28
TABELA 7 – Grau histológico dos carcinomas nos diferentes genótipos das pacientes	29
TABELA 8 – Presença ou ausência de envolvimento de linfonodos regionais nos diferentes genótipos das pacientes	29
TABELA 9 – Média do tamanho dos tumores de pacientes com diferentes genótipos	29
TABELA 10 – Avaliação do número de genótipos de risco em relação ao envolvimento de linfonodos regionais	30
TABELA 11 – Avaliação do número de genótipos de risco em relação ao grau histológico dos tumores	31
TABELA 12 – Avaliação do número de genótipos de risco em relação à média do tamanho dos tumores	31
FIGURA 1 – Papel do gene <i>CYP17</i> no metabolismo de hormônios esteróides	7
FIGURA 2 – Localização de GSTs da classe <i>um</i> e deleção completa do gene <i>GSTM1</i>	10
FIGURA 3 – Deleção completa do gene <i>GSTT1</i>	11
FIGURA 4 – Padrão de bandas dos polimorfismos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> (PCR Multiplex)	17
FIGURA 5 – Padrão de bandas do polimorfismo <i>CYP2E1-PstI</i>	18
FIGURA 6 – Padrão de bandas do polimorfismo <i>CYP17-MspA1</i>	20
QUADRO 1 – Iniciadores para PCR Multiplex dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> e <i>CYP1A1</i>	16
QUADRO 2 – Iniciadores para PCR do gene <i>CYP2E1</i> – <i>PstI</i>	18
QUADRO 3 – Iniciadores para PCR do gene <i>CYP17-MspA1</i>	19
GRÁFICO 1 – Estudo de Associação – <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	24
GRÁFICO 2 – Estudo de Associação – <i>CYP2E1</i> e <i>CYP17</i>	24
GRÁFICO 3 – Estudo de Associação – Genótipos de risco avaliados em conjunto	25
GRÁFICO 4 – Média do Tamanho dos Tumores	30

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, e por isso é responsável por uma alta mortalidade, principalmente entre as mulheres. O desenvolvimento de câncer depende de uma série de fatores, como a intensidade da exposição à carcinógenos exógenos e endógenos e a suscetibilidade genética do indivíduo. A biotransformação de carcinógenos é dividida em duas etapas: fase I – oxidação e biossíntese; fase II – degradação ou detoxificação. Polimorfismos gênicos responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas nestes processos influenciam diretamente a resposta individual a estes compostos. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo tipo caso-controle, procurando verificar a associação de polimorfismos nos genes do biometabolismo *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1* e *CYP17* com a carcinogênese mamária. A amostra estudada foi composta por 95 pacientes com carcinomas mamários e 95 controles, pareadas por faixa etária (± 5 anos) e por etnia. O DNA foi extraído pelo método de *salting-out* a partir do sangue periférico de pacientes e controles. Os polimorfismos genéticos foram analisados por PCR Multiplex e PCR-RFLP. A média de idade das pacientes foi de $57,39 \pm 14,01$ e para os controles foi $56,01 \pm 13,94$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre elas ($t=0,68$; $P>0,50$). Não houve associação entre os genótipos estudados e a susceptibilidade ao câncer de mama: *GSTM1* - OR = 0,96 (IC 95% = 0,54-1,69); *GSTT1* - OR = 1,16 (IC 95% = 0,76-2,14); *CYP2E1-PstI* - OR = 0,86 (IC 95% = 0,29- 2,53) e *CYP17-MspA1* - OR = 1,31 (IC 95% = 0,73-2,36). Ao calcular a OR para os genótipos considerados de risco em conjunto também não foram encontradas associações: mulheres com 2 genótipos de risco OR = 1,26 (IC 95% = 0,66-2,42) e mulheres com 3 ou 4 genótipos de risco OR = 1,32 (IC 95% = 0,55-3,18). A análise de fatores de risco relacionados à exposição ao estrogênio foi realizada entre todas as pacientes e controles, entre pacientes e controles com os genótipos de risco e entre pacientes com 3 genótipos selvagens e com 2 genótipos de risco. Os resultados estatisticamente significativos encontrados foram: média do número de filhos entre pacientes e controles ($t = -2,05$ $P<0,05$); idade da menopausa ($t= 2,041$; $P<0,05$) e uso de pílula ($t=3,94 > t_c=2,32$) para o genótipo *GSTT1*-nulo; o número de filhos para o genótipo *CYP17-MspA1* A1/A2 e A2/A2 ($t= -2,31$; $P<0,05$); a idade da menarca ($t= 2,40$; $P<0,05$) e idade da primeira gravidez ($t= 2,12$; $P<0,05$) entre as pacientes com diferentes combinações de genótipos de risco. Nas pacientes, os diferentes genótipos de cada gene foram analisados em função dos parâmetros clínicos: tamanho do tumor, grau histológico do carcinoma e envolvimento de linfonodos. Apenas a média do tamanho do tumor entre pacientes *CYP2E1* c1/c1 e c1/c2 diferiu estatisticamente ($t = 2,75 > t_c = 2,28$). Para estes parâmetros, também não foram encontradas diferenças significativas entre pacientes com vários genótipos de risco e pacientes com pelo menos 3 genótipos selvagens. Estes resultados sugerem que, para este estudo, os polimorfismos estudados não contribuíram para o risco de desenvolvimento do câncer de mama.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética na qual ocorrem mutações cumulativas em pontos específicos do DNA. Estas mutações alteram genes envolvidos no controle do ciclo celular e são responsáveis por desencadear uma proliferação desordenada das células contribuindo para o processo canceroso.

A biotransformação tem um importante papel na atividade carcinogênica e um balanço entre as reações do biometabolismo pode ser responsável por uma variação na suscetibilidade das células à ação de carcinógenos, visto que substâncias endógenas e exógenas ao serem metabolizadas pelo organismo podem ser ativadas e transformadas em metabólitos reativos (fase I) ou detoxificadas e eliminadas (fase II).

O carcinoma mamário é a neoplasia mais comum que afeta mulheres nos países ocidentais, sendo responsável por uma grande morbidade e mortalidade na população. Já são conhecidos diversos fatores de risco que aumentam a suscetibilidade ao câncer de mama, como o fumo, exposição à radiação ionizante, obesidade e principalmente os fatores reprodutivos (idade da menarca e da menopausa, número de filhos, idade da primeira gravidez), que irão influenciar diretamente o tempo de exposição da mulher ao hormônio estrogênio, que está relacionado ao desenvolvimento deste tipo de câncer. O potencial carcinogênico do estrogênio está relacionado à sua capacidade de estimular a divisão celular e a compostos carcinogênicos resultantes da biotransformação deste hormônio. Há várias enzimas envolvidas no metabolismo do estrogênio, tanto na fase I como na fase II.

Por causar possíveis efeitos na função da proteína ou em sua expressão, polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do estrogênio e de outros carcinógenos, poderiam ser responsáveis por uma maior suscetibilidade ao câncer de mama. Neste trabalho foram estudados genes do biometabolismo, codificadores de membros das famílias de enzimas do citocromo P450 (CYPs) e glutatona S-transferases (GSTs), através de PCR Multiplex Multiplex e PCR-RFLP, de 95 mulheres portadoras de câncer mamário e 95 indivíduos controles.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Identificar novos marcadores moleculares que auxiliem na prevenção, no prognóstico e terapêutica de portadores de tumores mamários. Para isso serão estudados polimorfismos dos genes do biometabolismo *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1E1* e *CYP17*.

Objetivos Específicos:

- Analisar a frequência alélica e genotípica destes polimorfismos em pacientes e controles;
- Realizar estudo tipo caso-controle, para verificar a presença ou ausência de associação dos polimorfismos estudados com a carcinogênese mamária;
- Correlacionar os diferentes genótipos em pacientes e controles com os fatores de risco (tempo de exposição ao hormônio estrogênio endógeno e exógeno);
- Correlacionar os diferentes genótipos das pacientes com a gravidade do estado clínico através da análise de: grau histológico dos carcinomas (I, II, ou III), tamanho do tumor (mm) e envolvimento de linfonodos regionais (presença ou ausência de metástases).

3. REVISÃO DA LITERATURA

Os primeiros estudos com observações relevantes sobre a origem e desenvolvimento do câncer datam de 1890, quando o patologista alemão David Von Hanseemann observou irregularidades nucleares e mitóticas em biópsias de carcinomas. No início do século XX, Theodor Boveri postulou que aberrações cromossômicas seriam responsáveis pelo comportamento maligno das células cancerosas, mas esta teoria só pôde ser confirmada após a década de 60, com a evolução dos estudos citogenéticos de células neoplásicas (MITELMAN, 1995). Posteriormente, o desenvolvimento de técnicas de manipulação gênica permitiu a clonagem e a identificação de genes localizados nos pontos de quebra das alterações cromossômicas, possibilitando um grande avanço nos estudos sobre a etiologia da doença.

O câncer é hoje claramente compreendido como uma doença genética, que ocorre pelo acúmulo de mutações em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Essas mutações se acumulam ao longo dos anos, até que a célula perde seus mecanismos de controle do crescimento e inicia um tumor (SUGIMURA, 1998). Dois tipos principais de mutações estão associados à formação de tumores: mutações que ativam os oncogenes e mutações que inativam os genes supressores tumorais.

Os oncogenes representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares normais que controlam uma variedade de processos associados com o crescimento, proliferação e diferenciação celular. (BISHOP, 1985; 1987; GORDON, 1985; WEINBERG, 1985). A ativação dos oncogenes celulares pode dar-se por alterações reguladoras, estruturais ou por mutações de ponto. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes comanda a proliferação anormal das células e a formação do tumor (COOPER, 1994).

As mutações em genes supressores de tumor são de grande importância na carcinogênese, pois alterações que inativam estes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), levando a proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991). A ativação de oncogenes e a inativação dos genes supressores tumorais representam, portanto, eventos complementares no

desenvolvimento do câncer, ambos contribuindo para aumentar a proliferação celular e a perda do controle do crescimento normal (COOPER, 1994).

Além do envolvimento de oncogenes, genes supressores e outros genes ligados ao ciclo celular, os processos ligados à senescência influenciam a carcinogênese por serem causadores de instabilidade genômica. Sabe-se que a incidência de câncer em seres humanos aumenta exponencialmente com a idade, referendando a sugestão de que múltiplas alterações genéticas são necessárias para a tumorigênese (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993). Entre as várias hipóteses para explicar esta associação, inclui-se o acúmulo de lesões no DNA devido à diminuição da capacidade de reparo. Assim, a probabilidade de uma determinada célula sofrer transformação dependerá da sua capacidade de metabolizar carcinógenos e de reparar o seu DNA.

A maioria dos carcinógenos genotóxicos que contribuem para o desenvolvimento de tumores em seres humanos é considerada inicialmente como pró-carcinógeno, sendo incapaz de reagir com o DNA, pois são compostos estáveis no pH fisiológico. A biotransformação de carcinógenos ocorre em duas etapas: primeiramente, os compostos são metabolizados por enzimas de fase I, muitas vezes numa reação de oxidação para a criação de centros reativos, tornando estes compostos capazes de se ligarem ao DNA e exibirem atividade carcinogênica (HATAGIMA, 2002). Na fase II, ocorre a detoxificação dos metabólitos primários, por conjugação destes com um substrato endógeno (glutaciona, sulfato, glicose, acetato). As enzimas envolvidas nesta fase agem como inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção rápida (THIER et al., 2003; NEBERT, 1991; PERSSON et al., 1995).

Muitas famílias de enzimas diferentes estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, mas as mais estudadas são: Citocromo P450 (CYPs), Glutaciona S-transferases (GSTs) e N-acetil-transferases (NATs). As enzimas da Família CYP atuam na fase I, também chamada fase de ativação, e as enzimas pertencentes às Famílias GSTs e NATs atuam na fase II, também chamada de fase de detoxificação (AUTRUP, 2000).

As enzimas pertencentes a estas famílias são codificadas pelos chamados genes do biometabolismo e muitos destes genes são pólímorficos, apresentando diferenças nas frequências alélicas entre populações de diversas origens étnicas.

Polimorfismos em genes do biometabolismo podem ocasionar um aumento da ativação de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos ou diminuir a capacidade de inativação destes compostos, sendo provável que indivíduos portadores de alguns polimorfismos tenham risco aumentado de desenvolvimento de cânceres quando expostos a carcinógenos (WÜNSCH e GATTÁS, 2001).

3.1. POLIMORFISMOS EM GENES DO BIOMETABOLISMO E CÂNCER

3.1.1. Genes da Família Citocromo P450 (CYPs)

Esta superfamília compreende pelo menos cinco subfamílias, designadas de A a E pelo sistema de nomenclatura recomendada (NEBERT et al., 1987), sendo que mais de 57 genes já foram descritos no genoma humano. Durante a biotransformação, os produtos destes genes atuam nas reações da fase I, fazendo a ativação de substâncias tóxicas. Entre os mais estudados estão os da família *CYP1* e *CYP2*.

O gene *CYP2E1* está mapeado no cromossomo 10 (10q24.3) entre outros dois genes de subfamílias diferentes de *CYPs*, *CYP2C* e *CYP17* (KOLBLE, 1993) e codifica uma enzima que catalisa a oxidação de muitos pró-carcinógenos, como etanol, benzeno, estireno e nitrosaminas. Além da conversão de pró-carcinógenos em carcinógenos, um outro mecanismo pelo qual o gene *CYP2E1* pode contribuir para a carcinogênese é pela liberação de espécies de oxigênio reativas, que causam danos oxidativos no DNA (PUROHIT et al., 2005). Já foram descritas 13 variantes alélicas para o gene *CYP2E1* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>) e é possível que variantes alélicas apresentem diferentes níveis de expressão da enzima, influenciando assim a suscetibilidade individual a carcinógenos (PERSSON et al., 1993). A tabela 1 apresenta as variantes alélicas do gene *CYP2E1* e suas características.

TABELA 1 – Variantes alélicas do gene *CYP2E1*

ALELO	PROTEÍNA	TIPO DE VARIAÇÃO	RFLP	ATIVIDADE DA ENZIMA		REFERÊNCIAS
				In vivo	In vitro	
CYP2E1*1A	CYP2E1.1	Nenhuma		Normal	Normal	Umeno et al, 1988
CYP2E1*1B	CYP2E1.1	9896C>G	TaqI-			Brockmüller et al, 1996 McBride et al, 1987
CYP2E1*1C	CYP2E1.1	6 repeats in the 5' flanking region				Hu et al, 1999
CYP2E1*1D	CYP2E1.1	8 repeats in the 5' flanking region	DraI e XbaI	Atividade aumentada após exposição ao álcool e em indivíduos obesos		McCarver et al, 1998 Hu et al, 1999
CYP2E1*2	CYP2E1.2	1132G>A			Reduzida	Hu et al, 1997
CYP2E1*3	CYP2E1.3	10023G>A			Normal	Hu et al, 1997
CYP2E1*4	CYP2E1.4	4768G>A			Normal	Fairbrother et al, 1998
CYP2E1*5A	CYP2E1.1	-1293G>C; -1053C>T (c1>c2); 7632T>A	PstI+ RsaI- DraI-			Watanabe et al, 1990 Hayashi et al, 1991 Persson et al, 1993
CYP2E1*5B	CYP2E1.1	-1293G>C; -1053C>T (c1>c2)	PstI+ RsaI-			Watanabe et al, 1990 Hayashi et al, 1991
CYP2E1*6	CYP2E1.1	7632T>A	DraI-			Persson et al, 1993
CYP2E1*7A	CYP2E1.1	-333T>A				Fairbrother et al, 1998
CYP2E1*7B	CYP2E1.1	-71G>T; -333T>A				Fairbrother et al, 1998
CYP2E1*7C	CYP2E1.1	-333T>A; -352A>G				Fairbrother et al, 1998

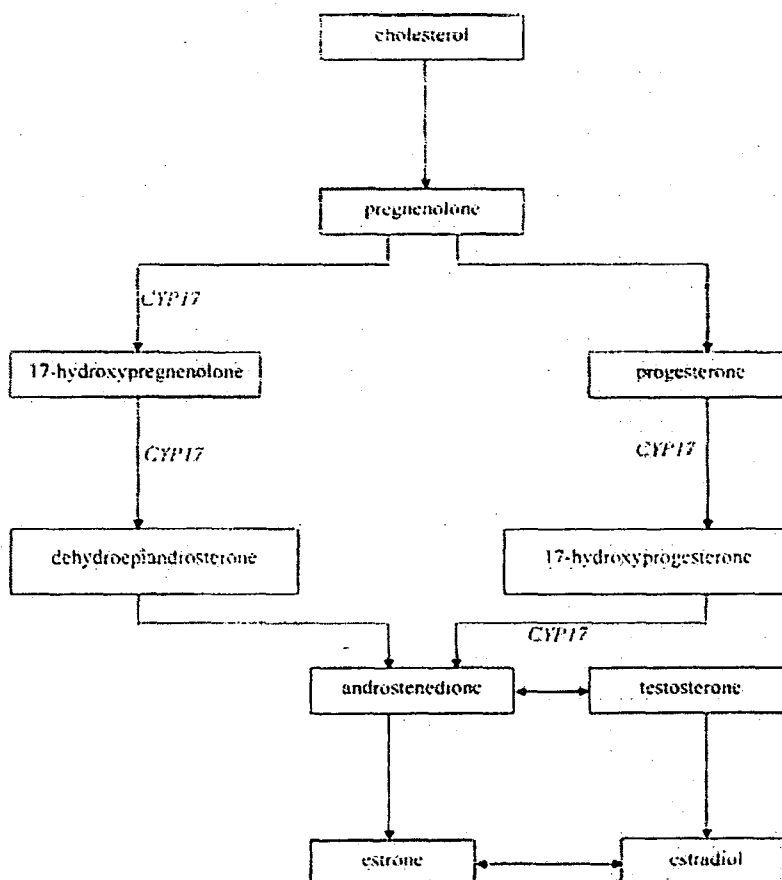
FONTE: Modificado de HUMAN CYTOCHROME P450 (*CYP*) ALLELE NOMENCLATURE COMMITTEE. Disponível em: <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>> Acesso em: outubro 2006.

Um dos polimorfismos descritos para este gene apresenta um sítio de restrição para a enzima *PstI* no alelo mutante (c2) devido a uma substituição G/C na posição -1293 do alelo selvagem (c1). A frequência do alelo mutante é relativamente baixa em diferentes populações, por exemplo, 5% em caucasóides (PERSSON et al., 1993) e este alelo parece estar associado a uma expressão aumentada do gene *in vitro* (HAYASHI et al., 1991) e *in vivo* (WATANABE et al., 1994), que resultaria em um aumento de suscetibilidade a diferentes tipos de cânceres, como o de pulmão (PERSSON et al., 1993; EL-ZEIN et al., 1997), cavidade bucal (HUNG et al., 1997) e esôfago (LIN et al., 1998).

O gene *CYP17* está localizado no cromossomo 10 (10q24.3) e contém 8 éxons e 7 íntrons (KRISTENSEN et al., 1999). Codifica a enzima citocromo P450c17 α , a qual está envolvida na síntese de estrogênio humano (AMBROSONE et al., 2003). Esta enzima apresenta um sítio ativo bifuncional: uma atividade catalítica que realiza a 17 α -hidroxilação de pregnolona e de progesterona; e uma atividade liase que é responsável pela conversão de 17 α -hidroxipregnenolona em

precursores de testosterona e de estrógenos (ver figura 1) (WESTON et al., 1998; HELZLSOUER et al., 1998). Nas glândulas adrenais, a 17α -hidroxipregnenolona juntamente com 17OH progesterona é utilizada para a síntese de glicocorticóides (NAKAJIN et al., 1984).

FIGURA 1 – Papel do gene *CYP17* no metabolismo de hormônios esteróides



FONTE: SHARP, L.; CARDY, A. H.; COTTON, S. C.; LITTLE, J. *CYP17* gene polymorphisms: prevalence and associations with hormone levels and related factors. A HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, 160, n. 8, 40-729, 2004.

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 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.

O impacto do polimorfismo genético de *CYP17-MspA1* 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 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 surtido 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 desta variante alélica (FEIGELSON et al., 1997; 1998), esta hipótese não foi comprovada em experimentos práticos (KRISTENSEN et al., 1999).

Outros genes polimórficos da família *CYP*, como *CYP1A1* e *CYP2D6*, também já foram associados à maior suscetibilidade ao câncer. O gene *CYP1A1* codifica uma enzima que catalisa o primeiro passo no metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), gerados pela combustão de fósseis, aminas aromáticas e presentes na fumaça do cigarro. Cerca de 10% dos indivíduos caucasóides são portadores de uma forma altamente induzível da enzima (PERERA, 1997). Em japoneses e em certas populações caucasóides, o risco aumentado de câncer de pulmão está correlacionado positivamente com um ou ambos os polimorfismos do gene *CYP1A1* (*MspI* e isoleucina – valina) (NAKACHI et al., 1991; KAWAJIRI et al., 1996; XU et al., 1996) e diretamente associado ao hábito tabagista.

O gene *CYP2D6* está mapeado em 22q13.1 (GOUGH et al., 1993) e codifica uma enzima envolvida no metabolismo de pelo menos 80 drogas, como antidepressivos, antiarrítmicos, neurolépticos, entre outros (AUTRUP, 2000). A

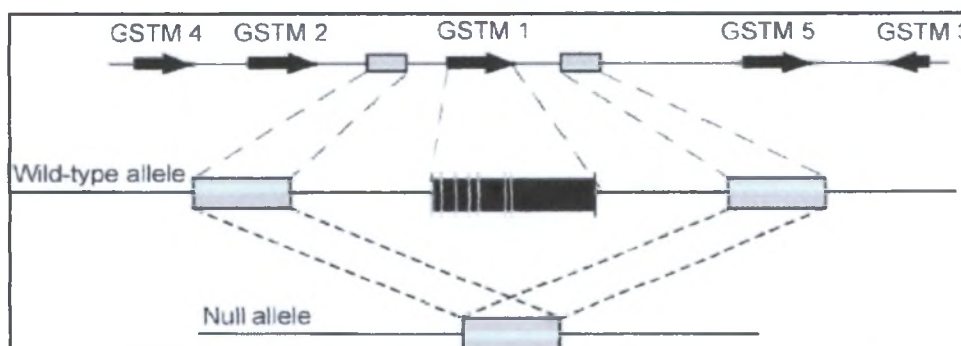
maioria dos indivíduos (80-90%) possui pelo menos um alelo selvagem (*CYP2D6*1*) e são classificados funcionalmente como bons metabolizadores. Outros indivíduos são metabolizadores lentos ou ultra-rápidos, respectivamente devido a uma mutação e à amplificação do alelo selvagem. Foi observada associação entre este gene e o carcinoma de pulmão (CAPORASO et al., 1989, 1990) e câncer bucal (WORRALL et al., 1998) e câncer de bexiga (ANWAR et al., 1996).

3.1.2. Genes da Família Glutathione S-transferases (GSTs)

As enzimas glutathione S-transferases (GSTs) possuem a função básica de detoxificação, mediando a conjugação de um grande número de compostos eletrofílicos com glutathione reduzida (GSH), numa reação metabólica de fase II (PICKETT et al., 1989). Sete classes distintas foram identificadas: *alpha* (α); *mu* (μ); *pi* (ρ); *sigma* (σ); *theta* (θ); *kappa* (κ) e *zeta* (ζ) (LANDI, 2000). Cada classe é codificada por um único gene ou por uma família gênica.

Na classe *mu*, cinco genes (*GSTM1* a *5*) foram mapeados no cromossomo 1 (1p13.3) (PERRSON et al., 1993) e encontram-se separados por aproximadamente 20 kb e alinhados na seguinte ordem: 5'....*GSTM4* – *GSTM2* – *GSTM1* – *GSTM5* – *GSTM3*...3'. O *GSTM3* localiza-se após o *GSTM5*, porém numa orientação 3'-5'. O gene *GSTM1* apresenta um alelo nulo que parece resultar de uma permuta desigual entre duas regiões altamente repetitivas idênticas que o flanqueiam, resultando em uma deleção de 16 kb que inclui todo o gene (ver figura 2). O fenótipo nulo tem uma frequência acima de 50% entre caucasóides, chineses e indianos (BOARD, 1990), sendo que esta deficiência pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de tumores, devido ao aumento da sensibilidade do indivíduo a carcinógenos químicos específicos (VAN POPPEL et al., 1992).

FIGURA 2 – Localização de GSTs da classe *mu* e deleção completa do gene *GSTM1*



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

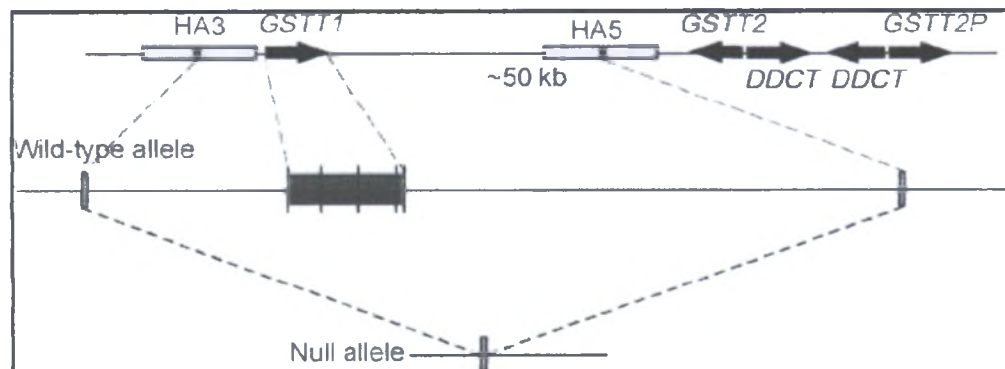
SEIDEGARD et al. (1986, 1990) encontraram uma associação entre o genótipo *GSTM1* nulo e suscetibilidade ao câncer de pulmão. ZHONG et al. (1993) descreveram uma maior frequência de indivíduos com este genótipo entre casos de câncer colorretal: 56,1% comparado com 41,8% do grupo controle. Mais de 70%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

LOHMUELLER et al. (2003) realizaram uma meta-análise de 301 estudos de associação genética, de 25 diferentes associações relatadas. Para oito destas associações, análises de estudos posteriores confirmaram estatisticamente a primeira publicação. Uma destas oito associações era entre *GSTM1* e o câncer de cabeça e pescoço, como relatado por TRIZNA et al. (1995). Este tipo de câncer mostra associação com o alelo nulo do gene *GSTM1* em homocigose.

Outro gene de importância nos estudos sobre suscetibilidade ao câncer, é o da classe *theta* *GSTT1*, mapeado no cromossomo 22 (22q11.2) (PEMBLE et al., 1994). Em humanos, a conjugação do halometano dependente de glutathione é polimórfica, com 60% da população classificada como "conjugadores" e 40% como "não conjugadores". PEMBLE et al. (1994) demonstraram que o gene *GSTT1* está ausente em 38% da população. A presença ou ausência do gene é coincidente com o fenótipo conjugador (*GSTT1+*) e não conjugador (*GSTT1-*). A ausência da enzima implica na não detoxificação de uma série de compostos, como os halometanos sintéticos e outros químicos industriais. De maneira semelhante à deleção do gene *GSTM1*, a deleção do *GSTT1* aparentemente é causada por uma recombinação homóloga envolvendo duas seqüências altamente repetitivas que flanqueiam o gene

(HA3 e HA5), resultando em uma deleção de 54 kb que contém o gene inteiro (ver figura 3) (PARL, 2005).

FIGURA 3 – Deleção completa do gene *GSTT1*



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

CHEN et al. (1996) descreveram um método para a caracterização simultânea dos alelos *GSTM1* e *GSTT1* e estudaram os genótipos em negros e caucasóides. A frequência do genótipo nulo para o *GSTM1* (*GSTM1*-) foi maior em brancos e para *GSTT1*- maior em negros. A frequência observada do genótipo "duplo nulo" não foi significativamente diferente do previsto, assumindo que os dois polimorfismos são independentes.

Outro importante polimorfismo dos genes GSTs, refere-se ao da classe *pi*, *GSTP1*. Este gene está localizado no cromossomo 11 (11q13) (MOSCOW et al., 1988; BOARD et al., 1989 e foram descritos quatro alelos polimórficos: o alelo selvagem *GSTP1A* e três variantes denominadas *GSTP1B*, *C* e *D*, resultantes de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos códons 105 e 114 (WATSON, 1998). Vários estudos têm demonstrado que as isoformas apresentam diferenças na especificidade de ligação ao substrato e na estabilidade térmica, conferindo diferentes atividades catalíticas (ALI-OSMAN et al., 1997; HARRIES et al., 1997). A expressão aumentada do gene *GSTP1* tem sido associada com a transformação maligna, resistência às drogas antitumorais e diminuição da sobrevivência (COMMANDEUR et al., 1995). Portadores dos alelos *B* e *C* parecem ter maior probabilidade de desenvolver de câncer de pulmão (RYBERG et al., 1997) e portadores do alelo *C* aparecem numa frequência quatro vezes maior entre os pacientes com glioma (ALI-OSMAN et al., 1997).

3.2. CARCINOMAS MAMÁRIOS

O carcinoma mamário é a neoplasia mais comum que afeta mulheres nos países ocidentais, observando-se um aumento de 1 a 2% de casos anuais (PANDIS et al., 1995). Estima-se que a cada ano ocorram mundialmente 999.000 novos casos de câncer de mama e 375.000 mortes (PARKIN et al., 2001). No Brasil, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente entre as mulheres e são esperados 48.930 novos casos para o ano de 2006, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2006).

As causas do câncer de mama não estão completamente elucidadas, porém são conhecidos alguns fatores de risco relacionados à suscetibilidade. A história familiar se constitui em um fator importante (o risco é duas a três vezes maior), principalmente se o câncer ocorreu na mãe ou na irmã e se desenvolveu em idade precoce. Outros fatores de risco, comuns a outros tipos de câncer, também estão associados ao câncer de mama como a obesidade pós – menopausa e exposição à radiação ionizante. A variação encontrada na incidência de câncer de mama no mundo é consequência de diferentes exposições ambientais e estilo de vida das populações. Entre os fatores ambientais, a exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) tem sido sugerida para a contribuição no desenvolvimento deste tipo de tumor (VAURY et al., 1995).

Embora o tabagismo seja uma das principais fontes de exposição aos PAHs, ainda é controversa a sua relação com o câncer de mama. Enquanto em alguns trabalhos o tabagismo parece não estar associado com o risco de câncer de mama (COLDITZ, 1993), outros estudos experimentais encontraram associação positiva, porém fraca, em indivíduos que apresentavam longa duração do hábito tabagista (PERERA et al., 1995; TERRY et al., 2002). Outros fatores que, embora controversos, parecem aumentar o risco de câncer de mama são o consumo elevado de álcool e de dieta gordurosa (PARKIN et al., 2001). A presença de doença proliferativa benigna da mama apresenta um risco relativo aumentado para o câncer de mama. As hiperplasias atípicas têm um risco maior que as típicas (INCA/MS, 2006).

Os fatores de risco reprodutivos e hormonais aumentam o risco de câncer de mama em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade)

e menopausa tardia (após os 50 anos de idade, em média), nuliparidade e idade da primeira gestação acima de 30 anos. O risco é elevado devido à exposição a altas taxas de estrogênio endógeno. O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam sendo alvos de muita controvérsia, por isso estes tratamentos devem ter a relação risco-benefício bem avaliada. Aparentemente, certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam pílulas com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo, têm maior risco (PARKIN et al., 2001).

Admite-se que o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama feminino está associado com uma prolongada exposição a níveis aumentados de estrogênio. O potencial carcinogênico do estrogênio tem sido relacionado não somente à sua capacidade de estimular a proliferação de células epiteliais mamárias, mas também ao papel dos estrogênios catecóis. Estes compostos são resultantes da biotransformação do estrogênio, e atuam como metabólitos carcinogênicos que podem se ligar ao DNA desencadeando danos no mesmo (LIEHR, 2000). Há várias enzimas envolvidas no metabolismo do estrogênio, tanto na fase I como na fase II, que são codificadas por sistemas gênicos polimórficos. Por causar possíveis efeitos na função da proteína ou em sua expressão, pode-se admitir que os polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do estrogênio poderiam predispor indivíduos ao câncer de mama e poderiam também influenciar o fenótipo clínico do tumor (HAN et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Este estudo foi realizado com amostras de sangue periférico de 95 pacientes portadoras de carcinomas mamários, obtidas do Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital das Clínicas de Curitiba, e 95 mulheres sem evidências de carcinomas mamários pareadas pela etnia e faixa etária (\pm 5 anos). Os indivíduos-controles eram pertencentes aos bancos de DNA do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da UFPR e do Laboratório de Mutagênese da UEL, moradoras do Asilo Maria Teresa, de São José dos Pinhais e outras doadoras voluntárias.

Foi realizado um contato pessoal com cada doadora, para a obtenção de informações sobre o histórico hormonal e reprodutivo (Anexo I) e o formulário para a assinatura do Consentimento Informado (Anexo II). 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.

4.2. PROCEDIMENTOS

- 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 foi imediatamente colocado em tubos estéreis contendo EDTA ou 1,75 ml de solução anti-coagulante-ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e enviados para o laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (UFPR) e mantidos a 4°C até o momento do processamento.

- Processamento do Sangue:

As amostras de sangue periférico de pacientes e controles foram centrifugadas a 2000rpm por 12 minutos com solução de RCLB 1X, processo repetido diversas vezes até a obtenção de um botão de glóbulos brancos, livre de hemácias. Após a separação completa, foram adicionadas às amostras 3 gotas de

solução PBS, e em seguida centrifugou-se novamente a 13.000 rpm por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante.

- **Extração do DNA sangüíneo:**

Foi utilizado o 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 a 100 µl de água ultrapura e armazenada a -20° C. Foi realizada a leitura da densidade óptica para a quantificação do DNA com o espectrofotômetro *Gene Quant pro*, e preparadas soluções de uso na concentração de 20ng/µl.

4.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DOS PRODUTOS

A técnica de PCR Multiplex foi utilizada para a detecção de alelos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, e a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) para os genes *CYP2E1* e *CYP17*. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para cada um dos locos estudados, já estando padronizadas as respectivas condições de amplificação e análise dos produtos. Todos os reagentes utilizados nas reações de PCR foram misturados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação. Em cada reação de PCR foi usado como controle negativo um microtubo contendo água no lugar do DNA genômico.

Os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2,0% para a PCR Multiplex e 2,8% para a PCR-RFLP. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta e documentados em sistema de captação de imagens pelo software "Digi doc-it".

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

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

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

Em cada microtubo de 0,5 ml, foram pipetados 5 µl do DNA genômico (20 ng/µl) previamente extraído e 20 µl da mistura de reação, somando um volume total de 25 µl.

Os oligonucleotídeos utilizados reação de PCR Multiplex estão apresentados no quadro abaixo:

QUADRO 1 – Iniciadores para PCR Multiplex dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e *CYP1A1* (controle interno)

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

Os microtubos foram submetidos ao programa apresentado abaixo em um termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf):

1 ciclo: 94°C por 5 minutos;

30 ciclos: 94°C por 2 minutos, 59°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto;

1 ciclo: 72°C por 4 minutos;

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

Padrão de bandas visualizado após a PCR Multiplex (figura 4): os iniciadores para o gene *CYP1A1* amplificam um fragmento constante de 312 pb, o qual é usado como controle interno da reação, excluindo a possibilidade de uma falsa interpretação dos resultados devido à ausência da reação de amplificação. O fragmento de 215 pb é visualizado somente nos casos de indivíduos que possuem o genótipo *GSTM1* positivo, e o fragmento de 480 pb apenas nos casos de indivíduos que possuem o genótipo *GSTT1* positivo. A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indica os respectivos genótipos nulos para cada gene.

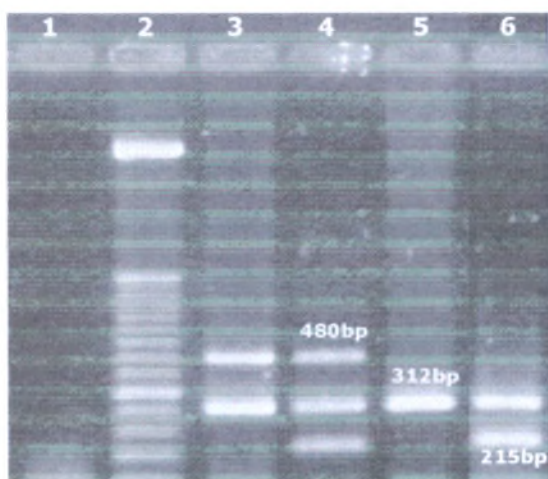


FIGURA 4 – Padrão de bandas dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* (PCR Multiplex):

- 1-Controle Negativo;
- 2-Marcador de Peso Molecular 50pb;
- 3-*GSTM1* - / *GSTT1* +;
- 4-*GSTM1* +/ *GSTT1* +;
- 5-*GSTM1* - / *GSTT1* -;
- 6-*GSTM1* +/ *GSTT1* -.

- AMPLIFICAÇÃO DO GENE *CYP1E1* - polimorfismo *Pst*I

O polimorfismo *CYP1E1*- *Pst*I é atribuído uma substituição G/C na posição -1293, a qual cria um sítio de restrição para a enzima *Pst*I, (Watanabe, 2000) resultando em três genótipos diferentes: um selvagem c1/c1, um heterozigoto c1/c2 e um mutante c2/c2.

A reação de PCR do polimorfismo *Pst*I para o gene *CYP2E1* foi baseada em KATO *et al* (1992) modificado, nas seguintes condições:

- 5,0 µl de tampão de PCR 10X: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl 10X concentrado;
- 1,5 µl (1,5 mM) de MgCl₂;
- 0,5 µl (20 mM) de dNTPs;
- 1,0 µl (25 pmol) dos iniciadores (Quadro 2).
- 2,5 U de Taq polymerase

- Adicionar água ultra-pura para completar o volume de 50 µl;

QUADRO 2 – Iniciadores para PCR do gene *CYP2E1* – *Pst*I

<i>CYP2E1</i> (<i>Pst</i>I)	sense (5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3')
	anti-sense (5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3')

Os microtubos foram submetidos ao programa apresentado abaixo em um termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf):

1 ciclo: 95°C/1 min;

25 ciclos: 95°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos;

1 ciclo: 72°C por 4 minutos;

Após o término da reação o produto da PCR foi mantido em geladeira (4°C) até a clivagem. A digestão enzimática foi realizada com a utilização da enzima de restrição *Pst*I com base no seguinte protocolo:

- 20 µl do produto de PCR;
- 3 U da enzima de restrição *Pst*I;
- 3,0 µl de tampão: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl₂, 10X concentrado.

Os produtos de PCR foram digeridos por cerca de 15 horas a 37° C.

Padrão de bandas visualizado após a PCR-RFLP (Figura 5): o genótipo homozigoto selvagem (c1/c1) não apresenta sítio de restrição para a enzima *Pst*I e origina um fragmento não clivado de 410 pb; o genótipo homozigoto mutante (c2/c2) é clivado pela enzima *Pst*I originando duas bandas: uma de 290pb e outra de 120pb; o genótipo heterozigoto (c1/c2) corresponde às três bandas de 410, 290 e 120 pb:

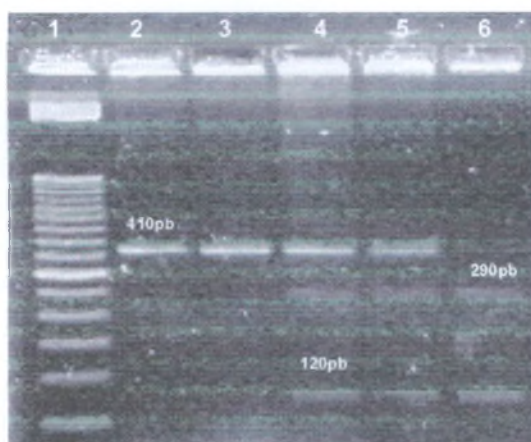


FIGURA 5 – Padrão de bandas do polimorfismo *CYP2E1-Pst*I:

1-Marcador de Peso Molecular 50pb;

2-Homozigoto selvagem (c1/c1);

3-Homozigoto selvagem (c1/c1);

4-Heterozigoto (c1/c2);

5-Heterozigoto (c1/c2);

6-Homozigoto selvagem (c2/c2).

- AMPLIFICAÇÃO DO GENE *CYP17* - polimorfismo *MspA1*

O polimorfismo *CYP17-MspA1* é atribuído a 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.

Para a análise deste polimorfismo as reações de PCR foram feitas com base no protocolo de MCKEAN-COWDIN et al. (2001), nas seguintes condições:

- 50 ng de DNA genômico;
- 50 pmol de cada iniciador (Quadro 3);
- 1,5 mM de MgCl₂;
- Tampão de reação 1X;
- 100 μM de dNTPs;
- 1U da enzima *taq* DNA polimerase.

QUADRO 3 – Iniciadores para PCR do gene *CYP17-MspA1*

<i>CYP17 (MspA1)</i>	CYP-1 (5'-CATTGCGCACTCTGGAGTC-3') CYP-2 (5'-AGGCTCTTGGGGTACTTG-3')
----------------------	---

Os microtubos foram submetidos ao programa apresentado abaixo em um termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf):

1 ciclo: 94° C por 5 minutos;

25 ciclos: 94° C por 5 minutos, 57° C por 1 minuto, 72° C por 5 minutos;

1 ciclo: 72°C por 5 minutos;

Após o término da reação, o produto da PCR foi mantido em geladeira (4°C) até a clivagem. A digestão enzimática foi realizada com a utilização da enzima de restrição *MspA1* com base no seguinte protocolo:

- 15 μl do produto de PCR;
- 1U da Enzima de restrição *MspA1*;
- 2U de BSA da mesma enzima;
- Tampão de reação 1X;

Os produtos da reação de PCR foram digeridos por 15 horas a 37° C.

Padrão de bandas visualizado após a PCR-RFLP (Figura 6): o genótipo homocigoto selvagem (A1/A1) não apresenta sítio de restrição para a enzima *MspA1* e origina um fragmento não clivado de 383 pb; o genótipo homocigoto mutante (A2/A2) é clivado pela enzima *MspA1* originando duas bandas: uma de 248pb e outra de 135pb; o genótipo heterocigoto (A1/A2) corresponde às três bandas de 383, 248 e 135 pb:

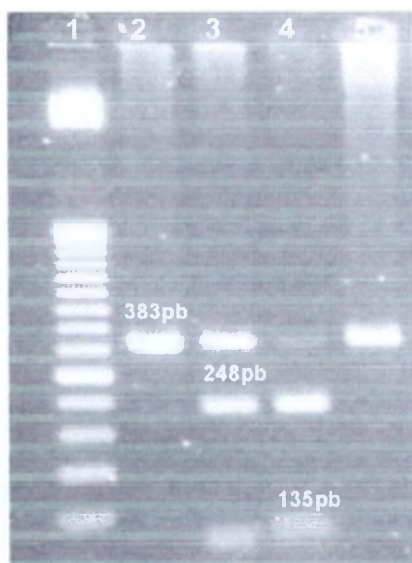


FIGURA 6 – Padrão de bandas do polimorfismo

CYP17-MspA1:

- 1-Marcador de Peso Molecular 50pb;
- 2-Homocigoto selvagem (A1/A1);
- 3-Heterocigoto (A1/A2);
- 4-Homocigoto mutante (A2/A2);
- 5-Homocigoto selvagem (A1/A1).

4.4. ANÁLISE DOS DADOS

As frequências genótípicas observadas foram comparadas por teste do qui-quadrado, com o objetivo de verificar se os genótipos obtidos se distribuíam igualmente em pacientes e controles.

Para os genes *CYP2E1* e *CYP17*, foram comparadas as frequências genótípicas observadas de pacientes e controles com as frequências esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg.

Para analisar a associação entre as variantes polimórficas estudadas e o câncer de mama, foram comparadas as frequências dos genótipos de risco dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1* e *CYP17* de indivíduos portadores de câncer de mama com as de indivíduos controles, através do teste de risco relativo (ODDS RATIO) com intervalo de confiança 95%.

Os diferentes fatores de risco, como a idade da menarca, idade da menopausa, tempo de uso de pílula anticoncepcional (exposição exógena ao estrogênio), tempo decorrido entre a menarca e a menopausa (exposição endógena ao estrogênio), número de filhos e idade da primeira gravidez, foram analisados através de testes de *Student (t)* entre pacientes e controles com os genótipos considerados de risco e entre pacientes com diferentes genótipos.

Os parâmetros histopatológicos das pacientes (grau histológico dos carcinomas, envolvimento de linfonodos regionais e tamanho do tumor) foram comparados entre os diferentes genótipos através do teste do qui-quadrado e teste *t*.

5. RESULTADOS

5.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS

A média de idade calculada para pacientes foi de $57,39 \pm 14,01$ e para os controles foi $56,01 \pm 13,94$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($t=0,68$; $P>0,50$). Em relação à etnia, 97% das pacientes e dos controles foram indivíduos caucasóides e 3% asiáticos.

No caso do gene *GSTM1*, 45 pacientes apresentaram o genótipo *GSTM1*-positivo (frequência $+/+$ e $+/-$ = 0,47) e 50 o genótipo *GSTM1*-nulo (frequência $-/-$ = 0,53). Nos controles foram observadas 44 mulheres *GSTM1*-positivo (frequência $+/+$ e $+/-$ = 0,46) e 51 *GSTM1*-nulo (frequência $-/-$ = 0,54) sendo que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas nos pacientes e nos controles ($\chi^2_1 = 0,021$; $P>0,80$).

Para o gene *GSTT1*, as frequências genotípicas observadas nas pacientes foram de 0,67 para o genótipo *GSTT1*-positivo ($+/+$ e $+/-$) e 0,33 para o genótipo *GSTT1*-nulo ($-/-$). Nos controles a frequência do genótipo *GSTT1*-positivo foi 0,70 e do *GSTT1*-nulo foi 0,30, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas nos pacientes e nos controles ($\chi^2_1 = 0,221$; $P>0,50$). Assumindo como pressuposto que o caráter sob estudo esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg é possível estimar a frequência de heterozigotos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*. Para o gene *GSTT1* a frequência estimada de heterozigotos foi de 0,40 nas pacientes e 0,39 nos controles; para o *GSTM1* a frequência de heterozigotos estimada foi de 0,50 em pacientes e 0,48 nos controles.

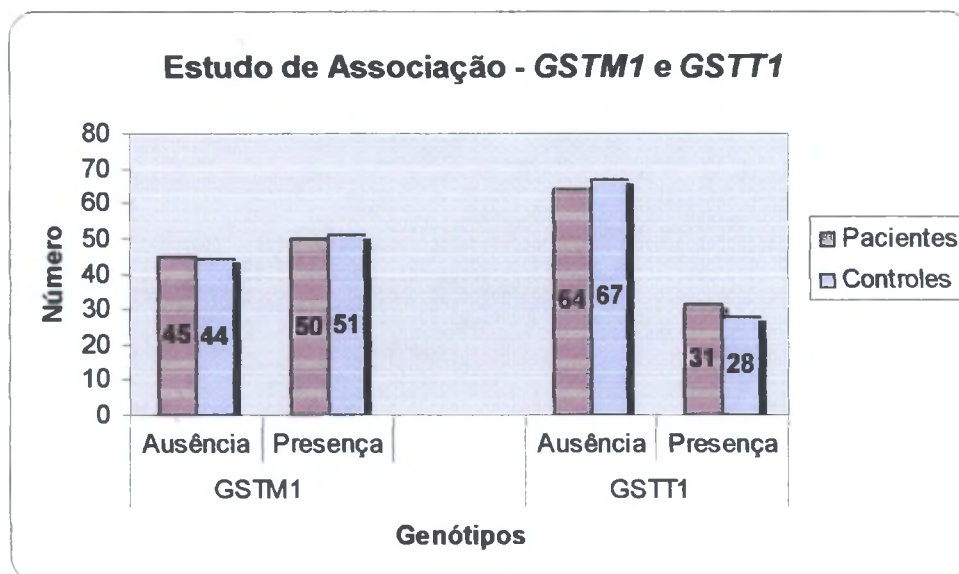
Para o gene *CYP2E1-PstI*, foram encontradas 59 (89%) pacientes com o genótipo homocigoto selvagem ($c1/c1$) e 7 (11%) com o genótipo heterocigoto ($c1/c2$). As frequências alélicas encontradas nas pacientes foram de 0,945 para o alelo selvagem e 0,055 para o alelo mutante. Entre os controles, foram encontradas 58 (88%) mulheres com o genótipo homocigoto selvagem e 8 (12%) heterocigotas. As frequências alélicas dos controles foram 0,94 para o alelo selvagem e 0,06 para o alelo mutante. Tanto nas pacientes quanto nas controles não foram encontrados indivíduos homocigotos mutantes ($c2/c2$). Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas nos pacientes e nos

controles ($\chi^2_1 = 0,075$; $P > 0,70$). As freqüências genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes ($\chi^2_1 = 0,20$; $P > 0,50$) quanto nos controles ($\chi^2_1 = 0,28$; $P > 0,50$).

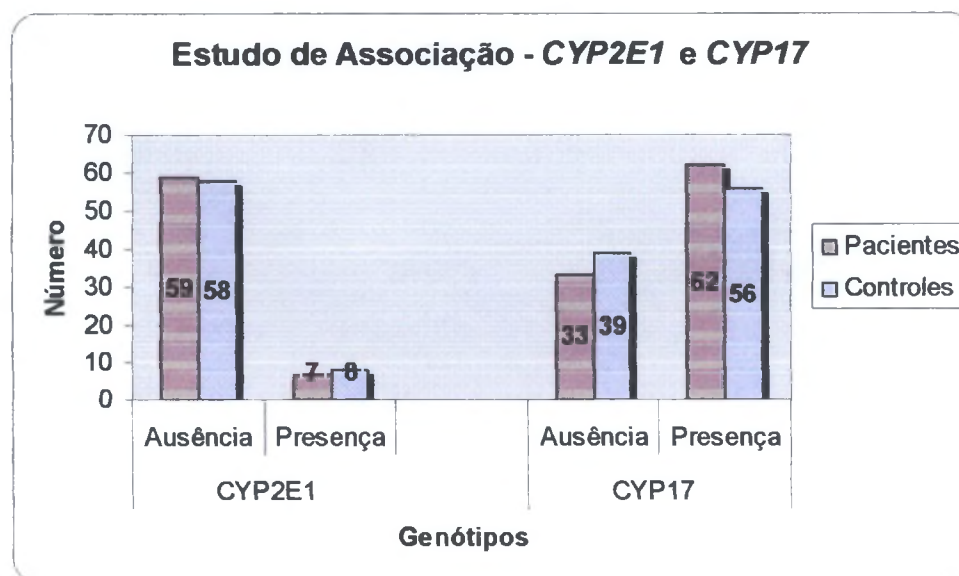
Em relação ao gene *CYP17-MspA1*, foram encontradas 33 (35%) pacientes com o genótipo homocigoto selvagem (A1/A1), 56 (59%) com o genótipo heterocigoto (A1/A2) e 6 (6%) com o genótipo homocigoto mutante (A2/A2). As freqüências alélicas encontradas nas pacientes foram de 0,641 para o alelo selvagem e 0,359 para o alelo mutante. Entre os controles, foram encontradas 39 (41%) mulheres com o genótipo homocigoto selvagem, 46 (48%) heterocigotas e 10 (11%) homocigotas mutantes. As freqüências alélicas dos controles foram 0,653 para o alelo selvagem e 0,347 para o alelo mutante. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genotípicas nos pacientes e nos controles ($\chi^2_2 = 2,48$; $P > 0,20$). As freqüências genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg nos controles ($\chi^2_1 = 0,44$; $P > 0,50$), porém não entre as pacientes ($\chi^2_1 = 7,57$; $P < 0,05$).

5.2. ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Para o estudo de associação, pacientes e controles foram comparadas quanto à presença ou ausência do genótipo considerado de risco dos quatro genes (*GSTM1*-, *GSTT1*-, *CYP2E1-PstI* c1/c2 e *CYP17-MspA1* A1/A2 + A2/A2). Não foram encontradas associações entre a presença do genótipo de risco e a suscetibilidade ao câncer de mama para nenhum dos genes estudados. Os valores do risco relativo calculado para os polimorfismos foram: *GSTM1* - OR = 0,96 (IC 95% = 0,54-1,69) e *GSTT1* - OR = 1,16 (IC 95% = 0,76-2,14) (ver gráfico1); *CYP2E1-PstI* - OR = 0,86 (IC 95% = 0,29- 2,53) e *CYP17-MspA1* - OR = 1,31 (IC 95% = 0,73-2,36) (ver gráfico 2).

GRÁFICO 1 – Estudo de Associação – *GSTM1* e *GSTT1*

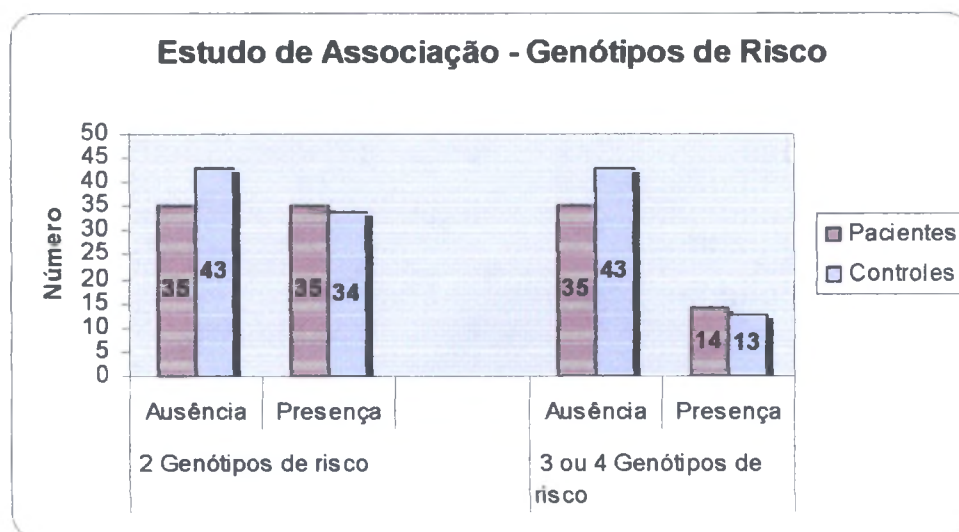
Avaliação de risco relativo entre pacientes e controles: *GSTM1* - OR = 0,96 (IC 95% = 0,54-1,69) e *GSTT1* - OR = 1,16 (IC 95% = 0,76-2,14).

GRÁFICO 2 – Estudo de Associação – *CYP2E1* e *CYP17*

Avaliação de risco relativo entre pacientes e controles: *CYP2E1-PstI* - OR = 0,86 (IC 95% = 0,29- 2,53) e *CYP17-MspA1* - OR = 1,31 (IC 95% = 0,73- 2,36).

Ao calcular as razões de probabilidade considerando os genótipos de risco em conjunto, também não foram encontradas associações com o risco de câncer de mama: mulheres com dois genótipos considerados de risco OR = 1,26 (IC 95% = 0,66-2,42) e mulheres com três ou quatro genótipos considerados de risco OR = 1,32 (IC 95% = 0,55-3,18) (ver gráfico 3).

GRÁFICO 3 – Estudo de Associação – Genótipos de risco avaliados em conjunto



Avaliação de risco relativo entre pacientes e controles: dois genótipos de risco OR = 1,26 (IC 95% = 0,66-2,42) e três ou quatro genótipos de risco OR = 1,32 (IC 95% = 0,55-3,18).

5.3. ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO

Pacientes e controles foram comparados em relação a seis fatores de risco: idade da menarca, idade da menopausa, exposição endógena ao estrogênio (idade da menopausa – idade da menarca), tempo de uso de anticoncepcional, número de filhos e idade da primeira gravidez. Os resultados estão apresentados na Tabela 2:

TABELA 2 – Fatores de Risco – Média de Pacientes e Controles

PXC	MENARCA		MENOPAUSA		EXPOSIÇÃO ENDÓGENA		PÍLULA		NÚMERO DE FILHOS		IDADE 1º GRAVIDEZ	
	P(83)	C(53)	P(69)	C(44)	P(61)	C(44)	P(30)	C(22)	P(84)	C(46)	P(48)	C(35)
Média	13,11 ±1,78	13,32 ±1,60	48,81 ±4,31	47,91 ±5,06	35,72 ±4,70	34,54 ±5,23	8,95 ±8,19	6,30 ±7,28	2,20 ±1,74	2,91 ±2,13	24,47 ±5,10	22,49 ±4,35
Teste t	t = 0,70; P>0,40		t = 1,01; P>0,30		t = 1,21; P>0,20		t = 1,20; P>0,20		t = 2,05; P<0,05		t = 1,84; P>0,05	

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

Dos fatores de risco analisados, apenas o número de filhos apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles.

Os fatores de risco foram também analisados para pacientes e controles portadoras dos genótipos considerados de risco (*GSTM1*-, *GSTT1*- e *CYP17-MspA1 A1/A2 + A2/A2*) e os resultados estão apresentados nas tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

TABELA 3 – Média dos fatores de risco em mulheres com genótipo *GSTM1*-nulo

<i>GSTM1</i>	MENARCA		MENOPAUSA		EXPOSIÇÃO ENDÓGENA		PÍLULA		NÚMERO DE FILHOS		IDADE 1º GRAVIDEZ	
	P(43)	C(28)	P(38)	C(24)	P(33)	C(24)	P(17)	C(12)	P(45)	C(25)	P(23)	C(17)
Média	12,98 ±1,81	13,21 ±1,20	49,47 ±3,79	47,67 ±5,07	36,03 ±4,27	34,50 ±5,01	6,53 ±7,72	7,39 ±13,9	2,18 ±1,81	2,44 ±2,10	24,65 ±4,63	22,65 ±4,85
Teste t	t = 0,67 < t _c = 2,02		t = 1,60; P>0,10		t = 1,46; P>0,10		t = 0,31 < t _c = 2,06		t = 0,55; P>0,50		t = 1,33; P>0,10	

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

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre pacientes e controles com o genótipo *GSTM1*-nulo para nenhum dos fatores de risco analisados.

TABELA 4 – Média dos fatores de risco em mulheres com genótipo *GSTT1*-nulo

<i>GSTT1</i>	MENARCA		MENOPAUSA		EXPOSIÇÃO ENDÓGENA		PÍLULA		NÚMERO DE FILHOS		IDADE 1º GRAVIDEZ	
	P(27)	C(13)	P(21)	C(11)	P(19)	C(11)	P(9)	C(6)	P(29)	C(12)	P(17)	C(9)
Média	12,70 ±1,51	13,08 ±1,44	50,52 ±4,12	47,27 ±4,58	37,05 ±4,68	34,18 ±4,24	14,67 ±8,86	2,75 ±1,60	2,55 ±2,24	3,83 ±1,70	22,18 ±3,86	21,33 ±3,35
Teste <i>t</i>	<i>t</i> = 0,74; P>0,40		<i>t</i> = 2,041 P<0,05		<i>t</i> = 1,67; P>0,10		<i>t</i>' = 3,94 > <i>t</i>c = 2,3		<i>t</i> = 1,77; P>0,05		<i>t</i> = 0,55; P>0,50	

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

Para o genótipo *GSTT1*-nulo, a média de idade da menopausa e a média do tempo de uso de pílula anticoncepcional apresentaram diferenças estaticamente significantes entre pacientes e controles. Os demais parâmetros não diferiram estatisticamente.

Para o genótipo *CYP17-MspA1* A1/A2 e A2/A2 apenas a média do número de filhos apresentou diferença estatisticamente significativa.

TABELA 5 – Média dos fatores de risco em mulheres com genótipo *CYP17-MspA1* A1/A2 e A2/A2

<i>CYP17</i>	MENARCA		MENOPAUSA		EXPOSIÇÃO ENDÓGENA		PÍLULA		NÚMERO DE FILHOS		IDADE 1º GRAVIDEZ	
	P(52)	C(31)	P(39)	C(23)	P(34)	C(23)	P(17)	C(15)	P(52)	C(27)	P(23)	C(19)
Média	12,90 ±1,83	13,22 ±1,63	48,59 ±4,18	47,26 ±4,83	35,68 ±4,23	34,04 ±5,08	8,94 ±8,54	4,14 ±5,01	1,88 ±1,58	2,85 ±2,09	24,65 ±5,60	22,21 ±4,26
Teste <i>t</i>	<i>t</i> = 0,81; P>0,40		<i>t</i> = 1,14; P>0,10		<i>t</i> = 1,29; P>0,20		<i>t</i> ' = 1,96 < <i>t</i> c = 2,19		<i>t</i> = 2,37; P<0,05		<i>t</i> = 1,56; P>0,10	

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

Não foram comparadas as médias dos fatores de risco para mulheres com o genótipo de risco do gene *CYP2E1* (c1/c2), pois apenas 7 pacientes e 8 controles apresentaram este genótipo.

Para analisar a possibilidade de um efeito interativo entre os quatro genes, as pacientes foram separadas de acordo com o número de genótipos de risco que apresentavam, assim, foram estabelecidas três classes: P_1 = pelo menos 3 genótipos selvagens (*GSTM1+*, *GSTT1+*, *CYP2E1-PstI* c1/c1 e *CYP17-MspA1* A1/A1), P_2 = com 2 genótipos de risco (*GSTM1-*, *GSTT1-*, *CYP2E1-PstI* c1/c2 e *CYP17-MspA1* A1/A2 e A1/A2), e P_3 = com 3 ou 4 genótipos de risco. Foram comparadas as médias dos fatores de risco entre as classes P_1 e P_2 (tabela 6), sendo que as médias de idade da menarca e da primeira gravidez apresentaram resultados estatisticamente significativos. A classe P_3 não pode ser comparada para os fatores de risco devido ao pequeno número amostral.

TABELA 6 – Média dos fatores de risco em pacientes com 3 genótipos selvagens e 2 genótipos de risco

P_1 X P_2	MENARCA		MENOPAUSA		EXPOSIÇÃO ENDÓGENA		PÍLULA		NÚMERO DE FILHOS		IDADE 1º GRAVIDEZ	
	$P_1(30)$	$P_2(31)$	$P_1(26)$	$P_2(27)$	$P_1(23)$	$P_2(14)$	$P_1(11)$	$P_2(11)$	$P_1(31)$	$P_2(33)$	$P_1(20)$	$P_2(15)$
Média	13,70	12,58	48,08	49,26	34,35	36,62	10,04	9,00	2,16	2,18	26,15	22,67
	$\pm 1,82$	$\pm 1,82$	$\pm 4,87$	$\pm 3,47$	$\pm 4,96$	$\pm 4,15$	$\pm 7,42$	$\pm 10,4$	$\pm 1,29$	$\pm 2,24$	$\pm 5,04$	$\pm 4,50$
Teste <i>t</i>	$t = 2,40; P < 0,05$		$t = 1,02; P > 0,30$		$t = 1,44; P > 0,10$		$t = 0,27; P > 0,70$		$t = 0,04 < t_c = 2,04$		$t = 2,12; P < 0,05$	

P_1 = pacientes com pelo menos 3 genótipos selvagens; P_2 = pacientes com 2 genótipos de risco; (n) = número de indivíduos.

5.4. PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

Entre as pacientes, os diferentes genótipos de cada gene estudado também foram analisados em função da gravidade do estado clínico. Os parâmetros histopatológicos avaliados foram: grau histológico do carcinoma (I, II ou III), envolvimento de linfonodos regionais (presença ou ausência) e tamanho do tumor (média).

Os resultados da análise do grau histológico e do envolvimento de linfonodos estão apresentados nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

TABELA 7 – Grau histológico dos carcinomas nos diferentes genótipos das pacientes

GRAU	GSTM1		GSTT1		CYP2E1		CYP17	
	+	-	+	-	c1/c1	c2/c2	A1/A1	A1/A2 A2/A2
I	9	9	10	8	13	2	6	12
II	22	32	36	18	30	4	21	33
III	9	7	13	3	11	1	6	10
χ^2_2	$\chi^2_2 = 1,39; P > 0,50$		$\chi^2_2 = 2,54; P > 0,20$		$\chi^2_2 = 0,17; P > 0,90$		$\chi^2_2 = 0,18; P > 0,90$	

TABELA 8 – Presença ou ausência de envolvimento de linfonodos regionais nos diferentes genótipos das pacientes

	GSTM1		GSTT1		CYP2E1		CYP17	
	+	-	+	-	c1/c1	c2/c2	A1/A1	A1/A2 A2/A2
Presença	19	24	29	14	27	2	18	25
Ausência	21	21	26	16	25	4	13	29
χ^2_1	$\chi^2_1 = 0,29; P > 0,50$		$\chi^2_1 = 0,28; P > 0,50$		$\chi^2_1 = 0,74; P > 0,30$		$\chi^2_1 = 1,09; P > 0,20$	

O número de pacientes com diferentes genótipos distribuiu-se igualmente nos diferentes graus histológicos e quanto à presença ou ausência de envolvimento de linfonodos regionais.

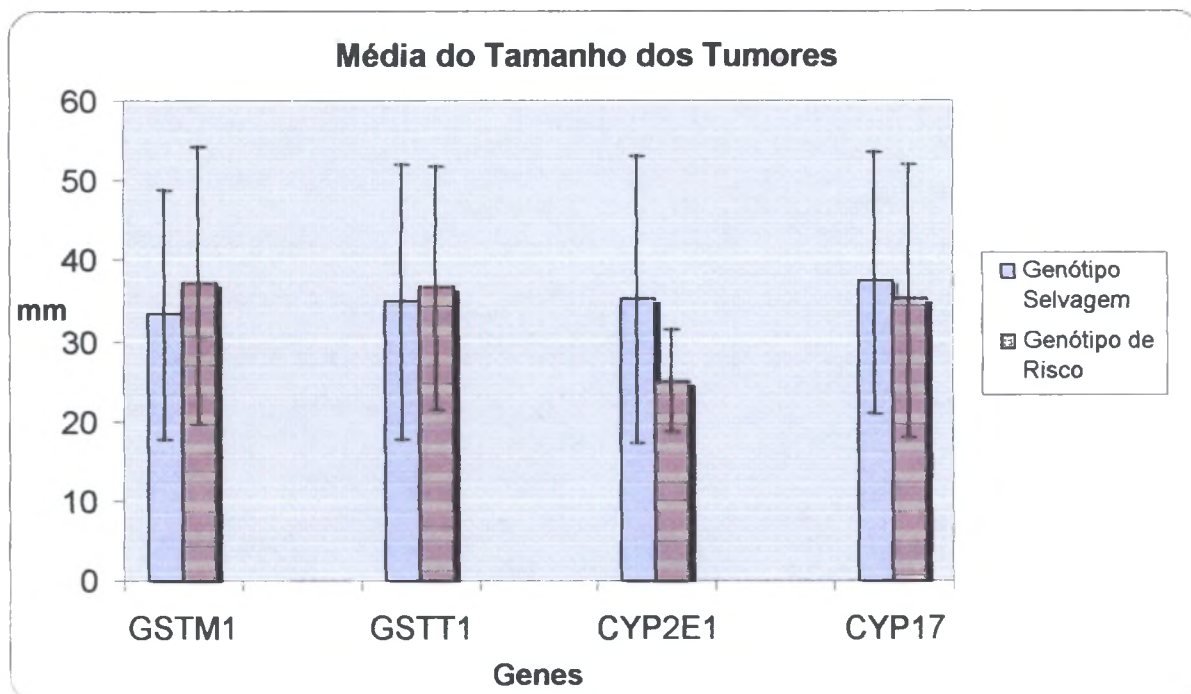
Os resultados da comparação entre as médias do tamanho dos tumores nos genótipos estudados estão apresentados na tabela 9 e no gráfico 4.

TABELA 9 – Média do tamanho dos tumores de pacientes com diferentes genótipos

	GSTM1		GSTT1		CYP2E1		CYP17	
	+(35)	-(43)	+(52)	-(26)	c1/c1 (46)	c2/c2 (6)	A1/A1 (24)	A1/A2 A2/A2(49)
Média (mm)	33,34	37,02	34,79	36,54	35,13	25	37,29	35,08
	$\pm 15,54$	$\pm 17,36$	$\pm 17,12$	$\pm 15,16$	$\pm 17,85$	$\pm 6,29$	$\pm 16,30$	$\pm 17,05$
Teste t	$t = 0,98; P > 0,30$		$t = 0,44; P > 0,60$		$t' = 2,75 > t_c = 2,28$		$t = 0,53; P > 0,50$	

(n)

GRÁFICO 4 – Média do Tamanho dos Tumores



Média e desvio padrão do tamanho dos tumores de pacientes com genótipo selvagem e genótipo de risco (em milímetros).

Estes mesmo parâmetros histopatológicos foram comparados entre pacientes com diferentes números de genótipos de risco, seguindo as classes estabelecidas previamente: P_1 = pelo menos 3 genótipos selvagens P_2 = 2 genótipos de risco, e P_3 = 3 ou 4 genótipos de risco. Os resultados estão apresentados nas tabelas 10, 11 e 12.

TABELA 10 – Avaliação do número de genótipos de risco em relação ao grau histológico dos tumores

GRAU	P_1	P_2	P_3
I	5	6	4
II	18	21	8
III	8	6	1
χ^2_4	$\chi^2_4 = 2,73; P > 0,50$		

P_1 = pelo menos 3 genótipos selvagens; P_2 = 2 genótipos de risco; P_3 = 3 ou 4 genótipos de risco.

TABELA 11 – Avaliação do número de genótipos de risco em relação ao envolvimento de linfonodos regionais

	P ₁	P ₂	P ₃
Presença	18	18	4
Ausência	13	13	9
χ^2	$\chi^2 = 3,22; P > 0,05$		

P₁ = pelo menos 3 genótipos selvagens; P₂ = 2 genótipos de risco; P₃ = 3 ou 4 genótipos de risco.

TABELA 12 – Avaliação do número de genótipos de risco em relação à média do tamanho dos tumores

	P ₂ (26)	P ₁ (30)	P ₃ (13)	P ₁ (30)	P ₂ (26)	P ₃ (13)
Média	38,60 ±16,46	36,73 ±18,01	31,31 ±16,48	36,73 ±18,01	38,60 ±16,46	31,31 ±16,48
Teste t	t = 0,41; P > 0,60		t = 0,91; P > 0,30		t = 1,33; P > 0,10	

P₁ = pelo menos 3 genótipos selvagens; P₂ = 2 genótipos de risco; P₃ = 3 ou 4 genótipos de risco.

O grau histológico do carcinoma e a presença ou ausência do envolvimento de linfonodos apresentaram-se igualmente distribuídos entre as três classes de pacientes. A média do tamanho dos tumores também não apresentou diferenças estatísticas entre as classes.

6. DISCUSSÃO

A identificação de alterações genéticas envolvidas na progressão do câncer tem fornecido uma variedade de marcadores moleculares e testes que podem redefinir os critérios para o diagnóstico desta doença e prover novos parâmetros para a detecção precoce, de fundamental importância por possibilitar um melhor procedimento terapêutico (SIDRANSKY, 1997).

O estudo de polimorfismos de genes de suscetibilidade ao câncer de mama e a avaliação da influência de diversos fatores ambientais, têm contribuído para um melhor entendimento dos mecanismos da doença. Muitos fatores reprodutivos são conhecidos por modular o desenvolvimento do câncer de mama: o número de filhos, a idade da menarca, da menopausa e da primeira gravidez, que influenciam diretamente no tempo de exposição da mulher ao estrogênio endógeno, bem como o uso de contraceptivos orais e os tratamentos de reposição hormonal, que aumentam a exposição ao estrogênio exógeno. O estudo destes fatores de risco e a análise molecular de polimorfismos em resposta a: enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de carcinógenos, podem fornecer dados importantes para avaliação do risco de desenvolvimento da doença.

Neste estudo analisamos os polimorfismos dos genes do biometabolismo *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1* e *CYP17*, em um grupo de 95 pacientes com câncer de mama esporádico e 95 controles, pareados por idade (\pm 5anos) e grupo étnico. A seleção destes genes, em especial das deleções nos genes *GSTM1* e *GSTT1* e dos polimorfismos *CYP2E1-PstI* e *CYP17-MspA1*, deve-se ao fato deles já terem sido relacionados a outros tipos de cânceres e também por serem genes que participam da via metabólica do estrogênio e de outros carcinógenos importantes, podendo assim influenciar a predisposição individual ou de grupos populacionais ao câncer de mama.

As freqüências genotípicas encontradas para o gene *GSTM1* não diferiram estatisticamente entre pacientes e controles ($\chi^2_1=0,021$; $P>0,80$) e foram similares às freqüências descritas na literatura para populações caucasóides. A freqüência encontrada do genótipo *GSTM1*-nulo em nosso estudo foi de 53% nas pacientes e 54% nos controles. GATTÁS E SOARES-VIEIRA (2000) analisando populações

caucasóides do Sudeste do Brasil descreveram que o gene *GSTM1* encontra-se ausente em 55 a 60,2% dos indivíduos.

Para o gene *GSTT1*, também não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas nos pacientes e nos controles ($\chi^2_1=0,221$; $P>0,50$) e a frequência encontrada para a deleção deste gene (33% nas pacientes e 30% nos controles) é maior do que a frequência de 23,1% encontrada em uma população brasileira dos estados de São Paulo e da Bahia (GATTÁS, 2004). NELSON (1995) descreveu uma grande variação da frequência do genótipo *GSTT1*-nulo entre diferentes etnias: Chineses (64,4%), Coreanos (60,2%), Americanos Afro-descendentes (21,8%) e Caucasóides (20,4%).

Para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, foi utilizada uma técnica que não permite a identificação dos heterozigotos, portanto não há possibilidade de obter-se por contagem direta a frequência de heterozigotos que constituem a amostra. No entanto, há possibilidade de estimar a frequência dos mesmos, desde que assumamos como pressuposto que o caráter sob estudo esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para o gene *GSTM1* a frequência estimada de heterozigotos foi de 0,40 nas pacientes e 0,39 nos controles; para o *GSTT1* a frequência de heterozigotos estimada foi de 0,50 em pacientes e 0,48 nos controles. A obtenção desta estimativa é importante por permitir uma avaliação mais precisa da dinâmica gênica na população estudada.

Para o gene *CYP2E1-PstI*, as frequências genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes ($\chi^2_1=0,20$; $P>0,50$) quanto nos controles ($\chi^2_1=0,28$; $P>0,50$) e se distribuíram igualmente entre pacientes e controles ($\chi^2_1=0,075$; $P>0,70$). A frequência do alelo mutante encontrada em pacientes e controles (5,5% e 6%) é similar à encontrada por ROSSINI (2006) em uma população do Rio de Janeiro (5%).

Em relação ao gene *CYP17-MspA1*, também não houve diferença significativa na distribuição das frequências genotípicas nos pacientes e controles ($\chi^2_2=2,48$; $P>0,20$) e as frequências genotípicas mostraram-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg apenas nos controles ($\chi^2_1=0,44$; $P>0,50$), mas não entre as pacientes ($\chi^2_1=7,57$; $P<0,05$), o que provavelmente ocorreu devido ao

tamanho amostral e impossibilita realizar comparações destes dados com outros descritos na literatura.

O estudo de associação não demonstrou resultados significativos entre os genótipos estudados e a susceptibilidade ao câncer de mama. Para o gene *GSTM1*, o resultado encontrado foi OR = 1,04 (IC 95% = 0,59-1,85). Em outros estudos com populações caucasóides o genótipo nulo também não foi associado ao desenvolvimento de câncer de mama: MILLIKAN et al. (2000) (OR = 0,9; IC 95% = 0,7-1,2) e AMORIM et al. (2002) (OR = 0,64; IC 95% = 0,36-1,13). O estudo recente de VAN DER HEL et al. (2005) também não encontrou associação do genótipo *GSTM1*-nulo com o câncer de mama (OR = 1,14; IC 95% = 0,93-1,42).

Entretanto, alguns autores descreveram associações deste genótipo e o câncer de mama: HELZLSOUER et al. (1998) e CHARRIER et al. (1999) encontraram um maior risco de desenvolvimento da doença em mulheres caucasóides em pós-menopausa com genótipo *GSTM1*-nulo (OR = 2,50; IC 95% = 1,34-4,65 e OR = 1,99; IC 95% = 1,19-3,32, respectivamente). Apesar desses resultados, ROODI et al. (2004) encontraram um efeito protetor desta deleção.

Quanto ao gene *GSTT1*, também não encontramos associação com o câncer de mama: OR = 1,33 (IC 95% = 0,73-2,43), resultado similar ao encontrado por AMORIM et al. (2002) (OR = 0,70; IC 95% = 0,35-1,39). BAILEY et al. (1998) analisaram outros genes além do *GSTT1*, mas não encontraram associação deles separadamente ou combinados com o câncer de mama em uma população caucasóide. MATHESON et al. (2002) encontraram o genótipo nulo associado com o câncer de mama em mulheres em pré-menopausa (OR = 3,15; IC 95% = 1,7-5,8) e MITRUNEN et al. (2001) também observaram esta tendência, porém sem significância estatística. Recentemente, VAN DER HEL et al. (2005) descreveram a associação do *GSTT1*-nulo com o câncer de mama em mulheres holandesas, sendo que as que apresentaram este genótipo tinham um risco maior (OR = 1,30; IC 95% = 1,04-1,64) do que as mulheres com genótipo *GSTT1*-positivo.

O gene *CYP2E1* codifica uma das principais enzimas envolvidas no metabolismo do álcool, por isso diversos estudos procuram verificar a associação de polimorfismos neste gene com o alcoolismo e diferentes tipos de câncer. CHOI et al. (2003) realizaram um estudo tipo caso-controle em pacientes com câncer de mama e encontraram um aumento de risco para mulheres consumidoras de álcool que

apresentavam o alelo c2 em relação a mulheres que não consumiam álcool e apresentavam o genótipo selvagem (OR = 1,9; 95% CI = 0.99-3.83) (P = 0.043). Em nosso estudo não encontramos associação do alelo mutante c2 com o câncer de mama : OR = 0,86 (IC 95% = 0,29- 2,53), entretanto não avaliamos o efeito da ingestão de álcool em conjunto com o genótipo de risco, o que poderia ser relevante para este gene.

Para o polimorfismo *CYP17-MspA1*, nossos resultados - OR = 1,31 (IC 95% = 0,73-2,36) - estão de acordo com dados de outros estudos. 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) 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). Por outro lado, FEIGELSON et al. (1998) descreveram que mulheres portadoras do alelo A2, por terem um maior nível hormonal circulante, teriam um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama e BERGMAN-JUNGSTROM et al. (1999) encontraram 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).

Muitos estudos analisam a combinação de diferentes genes e seus genótipos considerados de risco, com o objetivo de analisar o efeito interativo dos genes. Em nossa avaliação de risco relativo obtida com os genótipos combinados, não encontramos resultados significativos: mulheres com dois genótipos considerados de risco OR = 1,26 (IC 95% = 0,66-2,42) e mulheres com três ou quatro genótipos considerados de risco OR = 1,32 (IC 95% = 0,55-3,18).

HELZLSOUER et al. (1998) encontraram um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama associado com o aumento do número de genótipos considerados de risco dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* (OR = 3,77; IC 95% = 1,10-12,88). PARK et al. (2000) também encontraram um maior risco associado aos genótipos *GSTM1*-nulo e *GSTT1*-nulo (OR = 2,2; IC 95% = 1,1-4,5).

Um estudo recente, realizado em 2006 por RESZKA e colaboradores, analisou os efeitos da interação entre os genes *GSTM1* e *CYP2E1*. Para o polimorfismo *CYP2E1-PstI* analisado isoladamente, foi encontrado um efeito protetor do alelo mutante c2 (OR = 0,24, 95% CI = 0,08–0,74). Entretanto, quando os genótipos foram avaliados em conjunto foi encontrado um maior risco de desenvolver câncer de mama para indivíduos com os dois genótipos de risco (*GSTM1*- e *CYP2E1* c2/c2) (OR = 3,50, 95% CI = 1,01–16,55).

Como pode ser observado, muitos estudos tipo caso-controle apresentam resultados controversos, devido principalmente ao pequeno tamanho amostral. Além disso, sabe-se que as frequências alélicas dos genes do biometabolismo diferem substancialmente em diferentes etnias e/ou regiões geográficas específicas, o que contribui para uma menor consistência dos resultados descritos.

O fato de que muitas enzimas podem participar da via de detoxificação de um mesmo carcinógeno, é outro fator que contribui para a dificuldade em se determinar a influência dos polimorfismos em genes do biometabolismo na suscetibilidade ao câncer. COMSTOCK (1993) realizou um estudo das isoformas das enzimas da família *GSTM*, e constatou que elas apresentavam uma grande homologia, por exemplo, para a enzima *GSTM4* o índice de similaridade da seqüência de aminoácidos é de 87% com a *GSTM1*, 83% com a *GSTM2* e 70% com a *GSTM3*. Além desta similaridade estrutural, observa-se uma sobreposição de substratos, de maneira que a deficiência em uma isoenzima GST pode ser compensada por outras isoformas. Por estes motivos, seria necessária uma determinação de todos os genótipos GST para uma interpretação confiável do papel desta família de enzimas no desenvolvimento do câncer.

Para analisar a influência da exposição ao estrogênio com o câncer de mama, pacientes e controles foram comparados em relação a seis fatores de risco que modificam a taxa de exposição da mulher a este hormônio (idade da menarca, idade da menopausa, tempo entre a menarca e a menopausa, uso de pílulas anticoncepcionais, número de filhos e idade da primeira gravidez). Na comparação entre pacientes e controles, o número de filhos apresentou um resultado estatisticamente significativo ($t=2,05; P<0,05$), indicando que um maior número de filhos pode ter um efeito protetor para o câncer de mama. Um estudo publicado em 2002 pelo *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* demonstrou

que ter pelo menos um filho diminui o risco de desenvolver câncer de mama em relação a mulheres sem filhos, e este efeito protetor aumenta com o número de filhos.

Os fatores de risco também foram comparados entre pacientes e controles com os genótipos considerados de risco e os resultados estatisticamente significantes foram: idade da menopausa ($t=2,041$; $P<0,05$) e uso de pílula ($t'=3,94 > t_c=2,32$) para o genótipo *GSTT1*-nulo e o número de filhos para o genótipo *CYP17-MspA1* A1/A2 e A2/A2 ($t=2,31$; $P<0,05$). Para analisar uma possível interação entre os genótipos, as pacientes foram comparadas de acordo com o número de genótipos de risco que apresentavam, e a idade da menarca ($t= 2,40$; $P<0,05$) e a idade da primeira gravidez ($t=2,12$; $P<0,05$) diferiram estatisticamente entre pacientes com pelo menos três genótipos selvagens e pacientes com dois genótipos de risco.

Os demais fatores de risco não apresentaram diferenças significativas entre pacientes e controles e sugerem que, no nosso estudo, estes parâmetros não foram relevantes para o desenvolvimento do câncer mamário. No entanto, diversos estudos já demonstraram associação entre estes fatores e o risco de desenvolver câncer de mama. Em relação à exposição endógena ao estrogênio, um ano de atraso da primeira menarca está associado com uma redução de 5% no risco de desenvolver câncer de mama durante a vida, e cada ano de atraso para o início da menopausa está associado a um aumento de 3% no risco (TRAVIS e KEY, 2003). Para a exposição exógena devido ao uso de contraceptivos orais, uma meta análise de 54 estudos realizada em 1996 encontrou um pequeno aumento de risco em mulheres que utilizavam contraceptivos orais (OR= 1,24; IC 95%=1,15-1,33) (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996).

Para o nosso estudo, deve-se considerar que algumas pacientes e controles não responderam completamente as informações clínicas nos questionários, determinando que, para alguns parâmetros, o tamanho amostral ficasse ainda mais reduzido e, portanto, que nossos resultados sejam interpretados com cautela.

Na avaliação do grau histológico dos carcinomas e do envolvimento de linfonodos regionais, os testes de qui-quadrado não apresentaram resultados estatisticamente significativos (tanto na análise de cada gene individualmente quanto na análise dos quatro genes em conjunto), indicando que os diferentes graus

histológicos (I, II e III) distribuem-se igualmente nos diferentes genótipos considerados de risco, o mesmo acontecendo com a presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais. A comparação da média do tamanho dos tumores apresentou um resultado estatisticamente significativo ($t = 2,75 > t_c = 2,28$) para o polimorfismo *CYP2E1-PstI*, o que pode ter ocorrido devido ao pequeno número de indivíduos portadores do alelo mutante ($n=6$).

Como se pode observar no desenvolvimento deste trabalho, os resultados sobre a associação dos genes estudados e o risco de desenvolvimento de câncer de mama são em geral controversos. Este fato pode ser devido a fatores biológicos, como as diferentes distribuições gênicas em diferentes etnias, a desequilíbrios de ligação (PHAROAH et al., 2004), a exposição a fatores ambientais (DUNNING et al., 1999) e também devido a diferentes metodologias utilizadas em cada estudo.

Deve-se considerar nestes estudos do tipo caso-controle, a possibilidade de se obter resultados falso-positivos ao acaso (erro tipo I) e falso-negativos devido à falta de poder estatístico (erro tipo II) em amostras de tamanho reduzido (LOCHMUELLER et al., 2003). 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.

Além disso, sabe-se também que os genes do biometabolismo não agem isoladamente e a avaliação de múltiplos genes interagindo entre si e com a exposição aos carcinógenos pode ser necessária para compreender a verdadeira relação entre o polimorfismo estudado e o desenvolvimento do câncer de mama.

Nossos resultados sugerem que, apesar dos genes estudados estarem envolvidos no biometabolismo do estrogênio e de outros carcinógenos importantes, podem não contribuir de forma isolada para o risco de desenvolvimento do câncer de mama. No entanto, os mesmos podem ser relevantes na carcinogênese mamária humana, se analisados em uma atuação conjunta com outros genes não abordados neste estudo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho não demonstram, em sua maioria, associação positiva ou negativa entre os diferentes genótipos dos genes analisados e o risco de desenvolver câncer de mama. Também não foram observadas diferenças significativas entre a maioria dos fatores de risco (idade da menarca, idade da menopausa, número de filhos, tempo médio de exposição ao estrogênio endógeno e uso de pílula anticoncepcional) analisados nas pacientes e nos controles. Apenas a média do número de filhos apresentou um resultado estatisticamente diferente entre pacientes e controles, o que é consistente com os dados da literatura.

Na análise dos fatores de risco para os diferentes genótipos considerados de risco, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significativas:

- média de idade da menopausa e uso de pílula dos indivíduos *GSTT1*-;
- número de filhos nos indivíduos com genótipo *CYP17* A1/A2 e A2/A2;
- idade da menarca e a idade da primeira gravidez entre pacientes com pelo menos três genótipos selvagens e pacientes com dois genótipos de risco.

Estes dados corroboram a importância do metabolismo do estrogênio na gênese do câncer de mama, e a possível influência destes polimorfismos.

Não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros histopatológicos avaliados em pacientes com diferentes genótipos considerados de risco, com exceção da média do tamanho dos tumores para o gene *CYP2E1*. Estes resultados sugerem que, na nossa amostra, os diferentes polimorfismos avaliados não influenciam a gravidade do estado clínico.

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.
- ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R. A.; ANWAR, W. A.; AU, W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Lett.**, 107, 229-233, 1996.
- 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.
- 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.
- ANWAR, W.A.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.; MOSTAFA, H.M. AU, W.W. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYPED6 in Egyptian bladder cancer patients. **Carcinogenesis**, 17, 1923-1929, 1996.
- ARRUDA, V. R.; GRIGNOLLI, C. E.; GONÇALVES, M. S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin Genet.**, 54(3), 210-4, 1998.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat. Res.**, 464, 65-76, 2000.
- BAILEY, L. R.; ROODI, N.; VERRIER, C. S.; YEE, C. J.; DUPONT, W. D.; PARL, F. F. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. **Cancer Res.**, 58, 65-70, 1998.
- 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. **International Journal Cancer**, 84, 350-353, 1999.
- BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A. Protocols of the 12th Internacional Histocompatibility Workshop for Typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polimerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific

oligonucleotide probes (SSOP). In CHARRON, D. **HLA – Genetic diversity of HLA: functional and medical implication**. Paris: EDK, 1997.

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

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

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

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

CAPORASO, N. E.; TUCKER, M. A.; HOOVER, R. N.; HAYES, R. B.; PICKLE, L. W.; ISSAW, H. J.; MUSCHIK, G. M.; GREEN-GALLO, L.; BUIVYS, D.; AISNER, S.; RESAU, J. H.; TRUMP, B. F.; TOLLERUD, D.; WESTON, A.; HARRIS, C. C. Lung cancer and the debrisoquine metabolic phenotype. **J. Natl. Cancer Inst**, 82, 1264-1272, 1990.

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

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

CHEN, C.L.; LIU, Q.; RELING, M.V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase *M1* and *T1* polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. **Pharmacogenetics**, 6(2), 187-91, 1996

CHOI, J.Y.; ABEL, J.; NEUHAUS, T. Role of alcohol and genetic polymorphisms of *CYP2E1* and *ALDH2* in breast cancer development. **Pharmacogenetics**,13(2), 67-72, 2003.

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

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Breast cancer and breastfeeding: Collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. **Lancet**, 360,187-195, 2002.

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.

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

COMSTOCK, K.E.; JOHNSON, K.J.; RIFENBERY, D.; HENNER, W.D. Isolation and analysis of the gene and cDNA for human Mu class glutathione S-transferase, GSTM4. **J. Biol. Chem.**, 268, 16958-16965, 1993.

COOPER, G. M. Elements of human cancer. **Bost., Jon. and Bar. Publishers**, 1994.

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.; 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.

EL-ZEIN R, ZWISCHENBERGER JB, WOOD TG, ABDEL-RAHMAN SZ, BREKELBAUM C, AU WW. Combined genetic polymorphism and risk for development of lung cancer. **Mutat Res.** 381(2), 189-200, 1997.

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.; STANCZYK, F. Z.; HENDERSON, B. E. Cytochrome P450c17 α 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 α gene (*CYP17*) polymorphism predicts use of hormone replacement therapy. **Cancer Res.**, 59, 3908-3910, 1999.

GATTÁS, G. J. F.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and Glutathione S-Transferase mu (GSTM1) polymorphisms among Caucasians and Mulattoes from Brazil. **Occupational Medicine**, 50, 508-511, 2000.

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

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

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

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 Res.**, 59, 1015-1020, 1999.

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

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

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

HAYASHI, S.; WATANABE, J.; KAWAJIRI, K. Genetic polymorphisms in the 5-prime-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450II E1 gene. **J. Biochem.**, 110, 559-565, 1991.

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.

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 α* (*CYP17*) gene and risk factors for breast cancer. **Breast Cancer Res. Treatment**, 88, 217-230, 2004.

HUMAN CYTOCHROME P450 (*CYP*) ALLELE NOMENCLATURE COMMITTEE. Disponível em: <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>> Acesso em: outubro 2006.

HUNG HC, CHUANG J, CHIEN YC, CHERN HD, CHIANG CP, KUO YS, HILDESHEIM A, CHEN CJ. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; environmental factors and risk of oral cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, 6(11), 901-905, 1997.

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

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

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

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.

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

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

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

LIN DX, TANG YM, PENG Q, LU SX, AMBROSONE CB, KADLUBAR FF. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione S-transferases T1, P1, and M1 and cytochrome P450 2E1. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 11:1013-1018, 1998.

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.

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

McKEAN-COWDIN, R.; FEIGELSON, H. S.; PIKE, M. C.; COETZEE, G. A.; KOLONEL, L. N.; HENDERSON, B. E. Risk of endometrial cancer and estrogen replacement therapy history by *CYP17* genotype. **Cancer Res.**, 61, n. 3, 9-848, 2001.

MITELMAN, F. Chromosomes, genes and Cancer. **CA Cancer J Clin.**, 44 (3), 133-1935, 1994.

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

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

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.

NAKACHI, K.; IMAI, K.; HAYASHI, S.; WATANABE, J.; KAWAJIRI, K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. **Cancer Res.**, 51, 5177-5180, 1991.

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 α hydroxylase/C17,20-lyase cytochrome P450. **J. Biol. Chem.**, 259, 3971-3976, 1984.

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.

NELSON, H. H.; WIENCKE, J. K.; CHRISTIANI, D. C.; CHENG, T. J.; ZUO, Z. F.; SCHWARTZ, B. S.; LEE, B. K.; SPITZ, M. R.; WANG, M.; XU, X. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. **Carcinogenesis**, 16(5), 1243-5, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PUROHIT, V.; KHALSA, J.; SERRANO, J. Mechanisms of alcohol-associated cancers: introduction and summary of the symposium. **Alcohol**, 35, 155-160, 2005.

RESZKA, E.; WASOWICZ, W.; GROMADZINSKA, J. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. **British Journal of Nutrition**, 96, n. 4, 609-619, 2006.

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

ROSSINI, A.; SOARES LIMA, S.; RAPOZO, D. C. M.; FARIA, M.; ALBANO, R. M.; RIBEIRO PINTO, L. F. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. **Braz. Journal of Med. And Bio. Res.**, 39, 195-201, 2006.

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.

SHARP, L.; CARDY, A. H.; COTTON, S. C.; LITTLE, J. *CYP17* gene polymorphisms: prevalence and associations with hormone levels and related factors. A HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, 160, n. 8, 40-729, 2004.

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

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

SIDRANSKY, D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science*, 278: 1054-1059, 1997.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutat. Res.**, 402, 7-14, 1998.

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

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

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

TRIZNA, Z.; CLAYMAN, G. L.; SPITZ, M. R.; BRIGGS, K. L.; GOEPFERT, H. Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. **Am. J. Surg.** 170, 499-501, 1995.

TRAVIS, R. C.; KEY, T. J. Oestrogen exposure and breast cancer risk. **Breast Cancer Res.**, 5, 239-247, 2003.

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

VAN POPPEL, G.; DE VOGEL, N.; VAN BLADEREN, P. J.; KOK, F. J. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. **Carcinogenesis**, 13, 303-305, 1992.

VAURY, C.; LAINE, R.; NOGUIEZ, P.; DE COPPET, P.; JAULIN, C.; PRAZ, F.; POMPON, D.; AMOR-GUÉRET, M. Human glutathione S-transferase CYP1A1*2A

null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. **Cancer Res.**, 55, 5520-5523, 1995.

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

WATANABE, J., HAYASHI, S., KAWAJIRI, K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. **J. Biochem.**, 116, 321-326, 1994.

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

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

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

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.

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

WÜNSCH, V. F.; GATTÁS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, 17, n. 3, 467-480, 2001.

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

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

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO PESSOAL

Por favor, leia as questões seguintes cuidadosamente e responda-as da forma mais completa e precisa possível. A informação que você der não será associada a seu nome em nenhum documento público, e será conhecida somente pelos principais pesquisadores deste estudo. As informações que você der podem ter influência direta na interpretação dos nossos resultados, portanto, pedimos que coopere gentilmente, fornecendo informações corretas. Obrigado pelo interesse.

1- Nome:

último primeiro do meio

2- A ser preenchido pelo pesquisador:

Código: _____

Data: ____/____/____

Esta folha deve ser destacada do restante do questionário e preenchida pelo pesquisador. Somente o código será usado como identificação para as páginas subseqüentes. Se for necessário espaço adicional para complementar a sua resposta, escreva no verso da página e identifique a parte restante da questão com seu respectivo número.

Código nº _____

HISTÓRIA PESSOAL

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

Histórico de moradia

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

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

9- Qual a atividade profissional que exerceu ou exerce? Há quanto tempo?

10- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi: _____

Derivados de petróleo () sim () não

(querosene, gasolina, solventes,...)

Tintas/ corantes () sim () não

Indústrias têxteis ou tecelagem () sim () não

Praguicidas / Herbicidas () sim () não

Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...) () sim () não

Processamento de madeira () sim () não

Papel ou celulose () sim () não

Mineração () sim () não

Fábrica de sapatos ou curtume () sim () não

Metalúrgica () sim () não

Usina de açúcar ou álcool () sim () não

Plástico ou borracha () sim () não

Outras substâncias químicas: sim não

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

a) sim b) não

Histórico Tabagista

12- Você fuma atualmente? sim não

13- Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?

a) 0-5 anos b) 5-10 anos c) >10

14- Quanto você fuma/fumava por dia ? menos de ½ maço

de meio a 1 maço

mais de um maço

(quantos: _____)

15- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?

a) sim b) não

Histórico de Etilismo

16- Você consome/consumiu bebidas alcóolicas com frequência? sim não

17- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?

a) 0-5 anos. b) 5 –10 anos. c) mais 10 anos.

18- Que tipo de bebida alcóolica você costuma/ costumava consumir ?

a) Destiladas b) Não-Destilada c) Outra

19- Quanto você costuma/ costumava beber por semana?

no máximo um copo de 2 a 5 copos de 6 a 10 de 11 a 30 mais de 30

20- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?

a) Sim b) Não

Histórico de Saúde

21- Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas? sim não não me lembro

22- Você se submeteu a algum Raio-X?

sim não

23- Se SIM, quantos? a) Menos de 10 b) Mais de 10

Local: _____

24- Você tem ou já teve as seguintes doenças?

Pressão alta Diabetes Tuberculose Câncer

(localização do tumor _____)

25- Em casos de câncer na família, qual era o parentesco?

Pai Mãe Irmão Filho Tio Primo Outro

26- Qual era a localização do tumor?

Boca/garganta Pulmão Estômago Intestino Ginecológico Mama
 Outro (qual?) _____

27- Você já teve alguma moléstia venérea?

a) sim Qual? _____ b) não

Histórico hormonal e reprodutivo

28- Idade da primeira menstruação (menarca): _____

29- Idade da última menstruação (menopausa): _____

30- Sua menstruação é/era : regular irregular

31- Teve abortos espontâneos? sim Quantos: _____ não

32- Teve filhos? sim Quantos: _____ não

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

34- Usou ou usa pílulas anticoncepcionais?

sim Por quanto tempo: _____ não

Marcadores Tumorais

ERBB2: _____

TP53: _____

REP: _____

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

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO

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

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendendo 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