

RENATA GASPAROTTO PALEARI

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO C825T DO GENE DA
SUBUNIDADE β DA PROTEÍNA G E FATORES CLÍNICOS PARA
O CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO ZANATTA SARIAN

**Unicamp
2011**

RENATA GASPAROTTO PALEARI

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO C825T DO GENE DA
SUBUNIDADE β DA PROTEÍNA G E FATORES CLÍNICOS
PARA O CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de Oncologia ginecológica e mamária.

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO ZANATTA SARIAN

**Unicamp
2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

P174r Paleari, Renata Gasparotto
Relação entre polimorfismo C825T do gene da subunidade β da proteína G e fatores clínicos para o câncer de mama / Renata Gasparotto Paleari. Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Luis Otávio Zanata Sarian
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Câncer da mama. 2. Polimorfismo. 3. Reação em Cadeia de Polimerase. I. Sarian, Luis Otávio Zanata. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Relationship of C825T polymorphism of the G-protein beta subunit gene and clinical factors for breast cancer

Keywords: • Breast cancer
• Polymorphism
• Polymerase chain reaction

Titulação: Mestre em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luis Otávio Zanata Sarian

Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

Prof. Dr. Giuliano Mendes Duarte

Data da defesa: 25-02-2011

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: RENATA GASPAROTTO PALEARI

Orientador: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO ZANATA SARIAN

- Membros:**
- 1. Luís Otávio Zanatta Sarian
 - 2. José Maria Soares Júnior
 - 3. Giuliano Mendes Duarte

Luís Otávio Sarian
José Maria Soares Júnior
Giuliano Mendes Duarte

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 25/02/2011

201124371

Dedico este trabalho...

*...aos meus pais, Cleber e Maria Enira,
pelo amor incondicional,
exemplos de vida e caráter.*

*ao meu namorado, Coy, por me fazer mais feliz a cada dia,
pela cumplicidade, amor, confiança
e incentivo.*

*Aos meus irmãos Ricardo e Paulinha,
pelo carinho e apoio constantes.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Otávio Zanatta Sarian, pela orientação, apoio e ensinamentos;

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Drs. Giuliano Mendes Duarte e Renato Zocchio Torresan pela contribuição intelectual e correção desta dissertação;

À Dr^a Juliana K. R. Heinrich-Muçouçah, um grande exemplo de dedicação e sabedoria, pelo incentivo, confiança, e amizade e por compartilhar comigo (e com tantas outras pessoas) seu enorme conhecimento;

Ao Dr. Welbe Oliveira Bragança e Júlio Cesar Teixeira del Valle, por todos os ensinamentos e tempo dedicados;

Aos Drs. Sophie F. M. Derchain e Luiz Carlos Zeferino, pelo apoio logístico e institucional;

Às alunas de doutorado e iniciação científica, Raquel Mary Rodrigues Peres e Juliana Oquendo Florentino, respectivamente, responsáveis por parte desta dissertação;

Á todos os funcionários, alunos e estagiários dos Laboratórios Clínicos Especializados, que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Pela disponibilidade e ajuda, agradeço à, Denise da Rocha Pitta Lima de Moraes e Elizabete Aparecida Campos;

Ás grandes amigas e colegas de trabalho Mara Aparecida de Lúcio, Fernanda Aparecida Costa, Lúcia Maria Fagian de Carvalho, Lucilene da Silva Ferreira (Lulis) e Isabela Nelly Machado (e Caio), pelas palavras de incentivo e apoio, pelo carinho e por serem responsáveis por tornar meus dias melhores.

Ás amigas Natália Dal'Ava de Souza e Waleska de Oliveira Modesto pelas conversas, e companhia na vida acadêmica e pessoal;

E à Deus, que sempre guia meus passos...

Este estudo foi financiado pela

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) processos número 2009/11229-3,
2009/06148-4.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Summary.....	xii
1. Introdução.....	14
2. Justificativa.....	21
3. Objetivos.....	xxiii
3.1. Objetivo Geral.....	xxiii
3.2. Objetivos Específicos.....	xxiii
4. Publicação.....	24
5. Conclusões.....	43
6. Referências.....	44
7. Anexos.....	49
7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	49
7.2. Anexo 2 – Questionário.....	51
7.3. Anexo 3 – Ficha para coleta de dados clínicos.....	54
7.4. Anexo 4 – Parecer do CEP.....	56
7.4.1. Parecer projeto inicial.....	56
7.4.2. Parecer do adendo para inclusão do polimorfismo C825T.....	58
7.5. Anexo 5 – Fotografia da eletroforese.....	59
7.6. Anexo 6 – Tela de inserção de dados do <i>Software</i> IBIS.....	60

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CAISM – Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

CI/IC – Intervalo de confiança (*Confidence interval*)

et al. – E outro(s); e outra(s)

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GNB3 – *Guanine Nucleotide-Binding Protein, Beta-3*

IMC/BMI – Índice de Massa Corpórea / *Body Mass Index*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

SNP – Polimorfismo de único nucleotídeo (*Single-nucleotide polymorphism*)

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Objetivo: Avaliar a prevalência do polimorfismo C825T em mulheres com e sem câncer de mama e associá-lo ao índice de massa corpórea (IMC), ao risco individual para o câncer e características clínicas e reprodutivas. **Sujeitos e métodos:** Foram incluídas 134 mulheres com câncer de mama e um grupo controle de 129 de mulheres sem a doença. O grupo com câncer de mama respondeu a um questionário sobre estilo de vida, fatores reprodutivos e história familiar. Os dados clínicos do tumor também foram avaliados. A partir destes dados foi calculado o escore de risco individual para câncer de mama com o software *IBIS Breast Cancer Risk Evaluation Tool*. O DNA das pacientes foi extraído e realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do polimorfismo C825T. A análise estatística foi realizada através do pacote R Environment, com intervalos de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** A prevalência do genótipo TT se mostrou significativamente maior para as mulheres do grupo controle (30,2%) do que para as mulheres com câncer de mama (14,9%) ($p = 0,02$). O SNP não esteve associado a características clínicas do tumor (tamanho $p = 0,91$, grau histológico $p = 0,54$, receptor de estrógeno $p = 0,73$, receptor de progesterona $p = 0,46$, HER-2 $p = 0,9$, estado da axila $p = 0,29$, estágio da doença $p = 0,41$), a idade ao

diagnostico ($p=0,07$), idade da menarca ($p=0,17$) e idade da menopausa ($p=0,60$). O genótipo TT não se mostrou em maior prevalência nas pacientes com alto IMC ($p=0,98$). O risco para o câncer não mostrou ter relação com a presença do polimorfismo (em 10 anos $p=0,72$ e durante toda a vida $p=0,84$).

Conclusões: Coletivamente, os nossos dados indicam que o polimorfismo C825T, embora possivelmente associado a diversas vias metabólicas e carcinogênicas, não tem relação importante quer com o risco para o câncer de mama, quer com a apresentação das características da doença. Estes resultados expandem achados anteriores sobre a relação entre o polimorfismo C825T e o câncer de mama.

Summary

Objective: To evaluate the prevalence of the C825T polymorphism in women with and without breast cancer and associate it with the body mass index (BMI), the individual risk for cancer and clinical and reproductive characteristics.

Subjects and methods: We included 134 women with breast cancer and a control group of 129 women without the disease. The group with breast cancer responded to a questionnaire on lifestyle, reproductive factors and family history. Clinical data of the tumor were also evaluated. From these data we calculated the score of individual risk for breast cancer with the software IBIS Breast Cancer Risk Evaluation Tool. The DNA was extracted from patients and performed a Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of the C825T polymorphism. Statistical analysis was performed using the package R Environment, with intervals of 95% and a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Results: The prevalence of TT genotype was significantly greater for women in the control group (30.2%) than for women with breast cancer (14.9%) ($p = 0.02$). The SNP was not associated with clinical features of the tumor (size $p = 0.91$, histologic grade $p = 0.54$, estrogen receptor $p = 0.73$, progesterone receptor $p = 0.46$, HER-2 $p = 0.90$, status of the axilla $p = 0.29$, stage of disease $p = 0.41$), age at diagnosis ($p = 0.07$), age at menarche ($p = 0.17$) and age at menopause ($p = 0.60$). The TT genotype was not at a higher prevalence in patients with high BMI ($p = 0.98$). The risk for cancer showed no correlation with the presence of the

polymorphism (in 10 years $p=0.72$ and for life $p=0.84$). **Conclusions:** Collectively, our data indicate that the C825T polymorphism, although possibly associated with various metabolic pathways and carcinogenetics, has no significant relationship with either the risk for breast cancer, or with the presentation of the characteristics of the disease. These findings expand previous findings on the relationship between the C825T polymorphism and breast cancer.

1. Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de neoplasia, no mundo, e o mais comum entre as mulheres (1). No Brasil, aproximadamente 50.000 novos casos de câncer de mama são diagnosticados anualmente (2). Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste. Na região Norte é o segundo tumor mais incidente. A cada ano, cerca de 20% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (2).

A etiologia do câncer de mama é reconhecidamente multifatorial, sendo o resultado da interação de fatores genéticos com o estilo de vida, hábitos reprodutivos e meio ambiente. Dentre os fatores epidemiológicos de maior relevância, figuram pertencer ao sexo feminino, a idade e a história familiar. Etilismo, obesidade, a composição da dieta, a maior densidade mamária, exposição à radiação, baixo nível de atividades físicas e a etnia caucasóide estão associados a incrementos de menor monta na probabilidade de uma pessoa vir a desenvolver a doença. A exposição ao estrógeno, *per se*, provavelmente atuando como promotor da doença, também tem associação ao risco: tempo de menarca (precoce, antes dos 12 anos) e menopausa (tardia, depois dos 50 anos), nuliparidade, idade do primeiro filho (aumenta o risco após os 30 anos), amamentação, terapia de reposição hormonal, para minimizar os

sinais e sintomas do climatério, são condições associadas ao desenvolvimento mais provável de neoplasias mamárias (3). A obesidade também possui associação com o risco de desenvolvimento do câncer de mama na pós menopausa. Mulheres na pré menopausa sintetizam estrógeno, principalmente, nos ovários. No entanto, na pós menopausa, a síntese ovariana é repostada por síntese em locais periféricos, e em mulheres obesas na pós menopausa, o tecido adiposo é a principal fonte de biossíntese de estrógeno. Os mediadores da biossíntese de estrógeno na pós menopausa são as aromatases periféricas, um complexo de enzimas encontrado sobretudo no tecido adiposo. O andrógeno produzido pelo córtex da adrenal e pelo ovário pós menopausado é convertido em estrógeno pela aromatase (4). Além disso, a expressão e função do receptor de estrógeno estão relacionadas a vários tumores de mama. Sua expressão tem importantes implicações para terapias antiestrogênicas em câncer de mama (5).

A maioria dos cânceres de mama é esporádica, proveniente de mutações em células somáticas, enquanto estima-se que somente 5-10% são hereditários, decorrentes da herança de uma mutação germinativa ao nascimento. Alterações autossômicas dominantes raras em dois genes, *BRCA1* e *BRCA2*, que conferem um alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Provavelmente é o que ocorre para a maioria das famílias com múltiplos casos de cânceres precoces (6).

Os genes raramente atuam isoladamente na predisposição. Além da mutação nos genes *BRCA1* e/ou *BRCA2*, há um enorme plantel de genes que, por suspeição ou confirmadamente, também aumentam o risco de

desenvolvimento do câncer de mama sozinhos ou em sinergismo com outros genes (7).

Após a descoberta dos genes de suscetibilidade ao câncer, e levando em consideração sinergismos gene-gene e gene-ambiente, modelos de predição de risco e suscetibilidade genética foram desenvolvidos, com a finalidade de estimar a probabilidade de um indivíduo, desenvolver o câncer de mama. Alguns modelos levam em conta a história familiar do indivíduo para a neoplasia, outros consideram informações laboratoriais, confirmando ou não a presença de mutações genéticas (8).

Os testes genéticos levados em consideração por modelos de cálculo de risco requerem investimentos financeiros, e, portanto, há necessidade de se fazer a triagem e seleção de indivíduos que potencialmente possam se beneficiar das informações produzidas pelo teste. Existem mais de 12 softwares, que são ferramentas para cálculo de risco baseados em modelos estatísticos, que estimam os escores de risco ou a probabilidade de haver uma mutação através da história familiar e de outros fatores de risco pessoais e história reprodutiva. Estes modelos podem ser de diferentes categorias, como os empíricos (Myriad e Pen ou Couch), os mendelianos (BRCAPRO, BOADICEA e IBIS) e os *expert-based* (FHAT) (9). Existem também os modelos de Claus e de Gail, os quais são as ferramentas de avaliação de risco para câncer de mama mais utilizadas (10).

Quando uma mutação para predisposição ao câncer é identificada em uma família, esta tem a oportunidade de praticar uma prevenção primária. Opções como quimioprevenção, cirúrgicas de redução de risco, alterações na

dieta e estilo de vida e aumento na frequência do rastreamento podem ser usadas, em função do risco individual e das expectativas do paciente (11). Com o Projeto Genoma Humano e Genoma do Câncer Humano completos, especialistas prevêem uma era de “medicina personalizada”, a qual quer dizer que a suscetibilidade de um indivíduo seria usada para a prevenção da doença (12).

Além de mutações em genes mais conhecidos, que comprovadamente aumentam as chances do aparecimento do câncer, existem muitas outras variantes genéticas de baixa penetrância que modificam a suscetibilidade ao câncer de mama e que podem ser identificados por marcadores genéticos (13).

Candidatos potenciais para estes marcadores são os polimorfismos de um único nucleotídeo (*single-nucleotide polymorphism* - SNP), que alteram a sequência e/ou a expressão do produto do gene (13). Uma grande variedade de SNPs já foi investigada pela sua associação com o câncer de mama (14). Estes são SNPs em genes de reparo, genes do metabolismo de hormônios esteróides e genes do metabolismo da carcinogênese (15). Em geral, a forma mais comum da sequência dos genes é chamada de alelo tipo-selvagem e a sequência menos comum é chamada de alelo raro. Assim, o indivíduo pode ter genótipo homocigoto ou heterocigoto para determinada característica, dependendo do alelo que receber do pai e da mãe.

Alguns aspectos relacionados a mutações, as suas frequências, e as suas consequências são importantes de serem relatados quando se considera uma doença que pode ter como etiologia estas alterações. A mutação é a fonte de toda a variação genética, a matéria-prima da evolução. Somente uma

pequena porcentagem de mutações está ligada à etiologia de certas doenças. A maioria não causa impacto para a saúde ou para o desenvolvimento (16).

Algumas mutações são muito raras, outras são comuns na população. Toda vez que uma mutação ocorre em qualquer frequência que seja maior que 1%, é chamada de polimorfismo. Estes polimorfismos são comuns o suficiente para serem considerados uma variação normal do DNA, responsáveis por muitas das diferenças normais entre pessoas. Embora múltiplos polimorfismos não tenham efeitos negativos na saúde de um indivíduo, alguns deles podem agir aumentando o risco. Teorias atuais defendem que estes polimorfismos têm um efeito combinado no aumento do risco de câncer de mama (13 e 14).

Retomando a questão das associações gene-ambiente no desenvolvimento do câncer de mama, expomos aqui o foco de estudo desta dissertação, que é a participação de um polimorfismo, o C825T do gene *Guanine Nucleotide-Binding Protein, Beta-3 (GNB3)*, na obesidade, em outras características clínicas, e na predisposição individual ao desenvolvimento da neoplasia.

O *GNB3* codifica a subunidade $\beta 3$ da proteína G heterotrimérica, que é um componente chave na transdução de sinais intracelulares e está presente em todas as células do corpo (17). Este polimorfismo se localiza no éxon 10 do gene *GNB3* (que contém 12 éxons) situado no cromossomo 12, especificamente na posição 12p13 (18). Sua sigla se traduz, basicamente, na troca de um nucleotídeo com base citosina para um com base timina ou ao contrário, na posição 825. Assim, o indivíduo pode ter genótipo TT, CC (homozigotos) ou CT (heterozigoto) (19).

O polimorfismo tem importância biológica, pois a proteína G transmite sinais de cada um dos mais de 1000 receptores para os mais diferentes efetores, incluindo enzimas e canais iônicos. Esta proteína é composta por uma subunidade α que é frouxamente ligada a uma estrutura associada constituída por uma subunidade β e uma subunidade γ . A atividade da proteína G trimérica é regulada e ativada pela ligação e hidrólise da guanosina trifosfato (GTP) pela subunidade α . A subunidade α está sempre associada a uma guanosina difosfato (GDP), quando a proteína G encontra um receptor ativo, esta subunidade sofre uma mudança conformacional e troca uma GDP por uma GTP, assim se desliga das subunidades $\beta\gamma$ e promove a ativação de diferentes mecanismos de transdução de sinais intracelulares (20) (Figura 1).

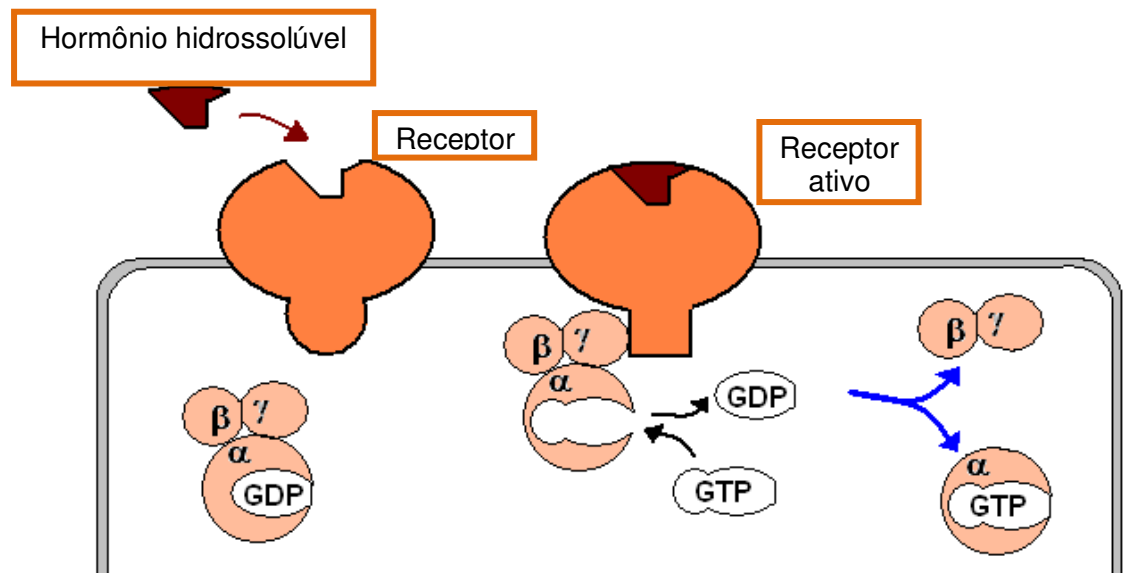


Figura 1: Ativação da proteína G.

Fonte: Aula Professor Pedro Silva (Universidade Fernando Pessoa, Portugal) disponível em <http://www2.ufp.pt/~pedros/qfisio/hormones.htm>.

O polimorfismo C825T está associado com a ocorrência de *splicing* alternativo (diferentes recombinações do RNA que leva à formação de tipos diferentes de proteínas), o que causa a perda de 41 aminoácidos. Este polimorfismo não altera a função da proteína G, mas aumenta a frequência com que ela realiza suas funções. Estas alterações provavelmente aumentam o risco para síndromes metabólicas (21). Além disso, a presença do polimorfismo também mostra uma associação significativa do alelo 825T com um aumento do índice de massa corpórea (IMC) e hipertensão (21 e 22). Este polimorfismo tem sido o assunto de muitas investigações clínicas e farmacológicas, já que indivíduos com o genótipo CC respondem melhor ao tratamento com a sibutramina. No entanto, resultados negativos de estudos associados também têm sido publicados, fato que deve ocorrer devido aos efeitos étnicos (23), uma vez que as frequências do alelo têm se mostrado diferentes em populações (22).

2. Justificativa

A proteína G está envolvida em vias muito importantes de sinalização intracelular de regulação e tem papel no controle do crescimento celular e mitoses, e suas atividades podem estar relacionadas com o desenvolvimento e crescimento de tumores (24).

Três linhas de inferência sugerem uma relação entre o polimorfismo C825T e o câncer de mama: 1) anormalidades na síntese da proteína G podem levar ao desenvolvimento de tumores, como o da mama (17, 21, 22 e 24); 2) muitos SNPs em genes de reparo e metabolismo estão ainda associados com câncer de mama e outros cânceres (25 e 26); 3) o polimorfismo é fortemente associado à obesidade, que por sua vez, é um potente fator de risco clínico para o câncer de mama (17 e 22).

Assim, a análise da frequência do polimorfismo C825T no gene desta proteína em mulheres com e sem o câncer de mama pode indicar uma possível relação deste com a oncogênese da mama. Pode também estimar se há ou não uma relação entre este e a obesidade e ainda, entre este e o risco individual para o desenvolvimento do câncer que estas mulheres apresentavam antes de ter o câncer em mulheres com a doença. Ou seja, pelo menos a princípio, o polimorfismo C825T tem associação confirmada com importantes fatores de

risco para neoplasias mamárias, como a obesidade. Há indícios, como afirmado anteriormente, que por atuar no controle da síntese da proteína, tal polimorfismo possa também facilitar o desenvolvimento de neoplasias, via alterações diretas no aparato de controle da proliferação e diferenciação celular (proteína G) (17 e 24). O presente estudo foi desenvolvido para avaliar tais associações, examinando conjuntamente a prevalência de obesidade, do polimorfismo C825T, e do câncer de mama.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a presença do polimorfismo C825T do gene da subunidade β da proteína G (*GNB3*) em mulheres com e sem câncer de mama, buscando, nas mulheres com a doença, uma associação da presença do polimorfismo com o IMC, o risco individual para o câncer e características clínicas e reprodutivas.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar a prevalência do polimorfismo em mulheres com (pacientes) e sem (controle) o câncer de mama.
2. Avaliar a associação entre a presença do polimorfismo e o IMC das pacientes.
3. Determinar o escore de risco individual para cada paciente e avaliar a associação deste com a presença do polimorfismo.
4. Avaliar a associação de características reprodutivas das pacientes e fatores clínicos do tumor com a presença do polimorfismo.

4. Publicação

Title: Relationship of C825T polymorphism of the G-protein beta subunit gene and clinical factors for breast cancer

Renata Gasparotto Paleari, Raquel Mary Rodrigues Peres, Juliana Oquendo Florentino, Juliana Karina Heinrich, Welbe Oliveira Bragança, Júlio Cesar Teixeira del Valle, Luiz Carlos Zeferino, Sophie Françoise Mauricette Derchain, Luis Otavio Sarian¹, M.D, PhD.

¹Campinas, Brazil

Address for correspondence:

Luis Otávio Sarian

Department of Obstetrics and Gynecology Faculty of Medical Sciences, PO Box 61 University of Campinas – UNICAMP, Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Acknowledgements

This study was funded by FAPESP (grant number 2008/02469-8). Juliana Oquendo Florentino and Raquel Mary Rodrigues-Peres received, respectively, 1-year (Fapesp 2009/11229-3) and 4-year studentships (Fapesp 2009/06148-4).

Abstract

Objective: To evaluate the prevalence of the C825T polymorphism in women with and without breast cancer and associate it with the body mass index (BMI), the individual risk for cancer and clinical and reproductive characteristics.

Subjects and methods: We included 134 women with breast cancer and a control group of 129 healthy women. The case group responded to a questionnaire on lifestyle, reproductive factors and family history. Clinical data were also evaluated. We calculated the risk for breast cancer with the software IBIS Breast Cancer Risk Evaluation Tool and performed a Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of the polymorphism. Statistical analysis was performed using the package R Environment, with intervals of 95% and a significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** The frequency of TT genotype was significantly greater for women in the control group (30.2%) than for women with breast cancer (14.9%) ($p = 0.02$). The polymorphism was not associated with clinical features, age at diagnosis ($p = 0.07$), age at menarche ($p = 0.17$) and age at menopause ($p = 0.60$). The TT genotype was not at a higher frequency in patients with high BMI ($p = 0.98$). The risk for cancer showed no correlation with the presence of the polymorphism. **Conclusions:** Our data indicate that the polymorphism, although possibly associated with various metabolic pathways and carcinogenetics, has no relationship with either the risk for breast cancer, or with the characteristics of the disease.

Key Words: Polymorphism, C825T, Breast cancer, Individual risk

Introduction

The C825T is a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the *GNB3* gene that codifies the G-protein beta-3 subunit. This heterotrimeric protein is involved in the regulation of intracellular signaling pathways and plays a role in the control of cell growth and mitosis (Roskopf et al., 2000). The activities of the G-protein may be related to the development and growth of tumors (Vallar, 1996). This SNP has been linked to the occurrence of a splice variant of *GNB3* and distinct cellular and metabolic features as well as an association with colorectal cancer risk and obesity (Siffert et al., 1998 and Hayakawa et al., 2007).

This SNP is a potential candidate for a biological marker of breast cancer risk. Three lines of inference suggest potential relationships: 1) abnormalities in protein G synthesis are associated with important intracellular signaling processes, cell growth and replication control, and may thus be associated with cancer development (Roskopf et al., 2000, Siffert et al., 1998, Hayakawa et al., 2007 and Vallar, 1996); 2) many SNPs in repair and metabolism genes were already associated with breast and other cancers (Menzel et al., 2004 and Lehnerdt et al., 2008); 3) the polymorphism is strongly associated with obesity which, in turn, is a potent clinical risk factor for breast cancer (Roskopf et al., 2000 and Hayakawa et al., 2007).

However, previous attempts to determine the association of the C825T polymorphism with breast cancer did not succeed. In the largest study to date, the prevalence of the TT genotype was similar in 500 women with breast cancer, matched to a control group of 500 healthy women (Krippel et al., 2004).

Other smaller study have also failed to demonstrate a clear association of the SNP with breast cancer (Menzel et al., 2004).

In the present study, we tried to circumvent these past shortcomings, by determining the prevalence of the CC, CT and TT genotypes of a large sample of women, with and without breast cancer. Most importantly, we also determined the prevalence of these genotypes as related to the BMI measurements in women with breast cancer, and also in relation to clinical and epidemiological features, including the individual risk for breast cancer as calculated with the IBIS software. With that approach, we had the opportunity to assess altogether the associations of the C825T polymorphism with 1) presence of breast cancer phenotype, 2) epidemiological features of the women and 3) patients' BMI.

Materials and methods

Patients

The sample of this study comprises 134 women with breast cancer and 129 controls, this later group consisting of women without breast malignancies, who attended our institutions' ambulatories for other gynecologic conditions. However, clinical data on these women are not currently available. The 134 cases were selected from a larger group of 158 consecutive women who were treated for breast cancer at the Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – CAISM/Unicamp. Data were obtained from October 2009 to October 2010. Women were first approached by the researchers immediately before surgery, when they were informed of the study's objectives and invited to enroll.

After signing the informed consent, the study subjects responded to a questionnaire addressing clinical and epidemiological features. A thorough physical examination was carried out by a skilled physician, and physical data e.g. weight and height were ascertained, among many other relevant clinical features. Then, blood samples were obtained. After surgery, the researchers retrieved the final pathological status of the breast tumors. From the original sample of 158 women, 9 were excluded because of insufficient clinical data, 11 because we were unable to obtain sufficient blood volumes, and another 4 women were excluded because the PCR reactions to determine their C825T status did not work.

The study protocol has been fully approved by the Ethics Review Board (CEP 901/2009).

Determination of the C825T status

DNA was extracted from leukocytes of peripheral blood through the Kit Wizard Genomic (Promega®). To detect the polymorphism C825T, DNA was amplified using the following primer pair: forward, 5-TGACCCACTTGCCACCCGTGC-3; reverse, 5-GCAGCAGCCAGGGCTGGC-3. The Polymerase chain reaction (PCR) was performed two times for each sample, in order to avoid false negative or false positive results. When, for some reason, we failed to obtain a reliable PCR result in one of the two reaction rounds, we performed a new round up until two agreeing PCR results were obtained. The reaction was carried out in a final volume of 20 µL containing 2 mM MgCl₂, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (Boehringer Mannheim,

Mannheim, Germany), 0.2 mM each primer, and 1 U of Taq DNA polymerase (Biotherm; Gene Craft, Münster, Germany). After an initial denaturation of 5 minutes at 95 °C, the samples were subjected to 35 cycles at 94 °C for 1 minute, 65 °C for 45 seconds, and 72 °C for 1 minute, with a final extension of 5 minutes at 72 °C. The 268-bp product was restricted with BseD1 (Fermentas®). The unrestricted 268-bp product represents the *T* allele, whereas a *C* allele was cut into 116- and 152-bp fragments. The three genotypes were scored after running on a 3% agarose gel with 3 µg/mL ethidium bromide.

Calculation of the Individual Risk for Breast Cancer (IBIS)

We used data gathered from the interview and medical files to calculate the individual risk for developing breast cancer. We aimed at obtaining an individual scenario with regards to the women's previous risk of developing a breast malignancy, although no clinically validated tool exists for this purpose. We thus decided to use the IBIS Breast Cancer Risk Evaluation Tool, which is a clinically validated model, and combines genetic factors and family history, personal factors such as reproductive history. The IBIS model was designed to assess the risk of developing breast cancer in healthy individuals, thus its use as in this report is not warranted (Tyrer et al., 2004). It was incorporated into a computer program that provides a personalized risk estimate for women that do not have breast cancer at the time. The variables and procedures related to the IBIS score calculation have been described elsewhere in detail (Tyrer et al., 2004).

Statistical analysis

All calculations were performed with the R Environment for Statistical Computing (R Development Core Team, 2010). Statistical significance was set to $p=0.05$ and 95% confidence intervals (95%CI) were used throughout. We used a generalized linear regression model to compare the prevalence of the C825T genotypes in patients and controls. Then, we calculated the T allele prevalence in patients and controls, which were compared using chi-squares. We then restricted the analysis to women with breast cancer (cases). We first used univariate analysis (chi-squares, Fisher's, T test and Kruskal-Wallis rank sum tests where appropriate) to compare the clinical and pathological features according to the C825T genotypes. We next assessed those proportions in a multivariate fashion, with logistic regression models fit to evaluate altogether the 1) clinical features of the women and 2) the characteristics of the disease.

Results

The mean age at diagnosis of the women was 56.8 (SD \pm 15.2) years. Roughly 49% of the women were 55 years of age or older, whereas only 20 (14.9%) women were 40 years of age or younger. Approximately 66% of the women were postmenopausal, and 77% had two or more offspring. The age at menarche was less than 12 years for 42% of the women, and 91% of the women had their first pregnancy when they were 35 years old or younger. Most (73%) postmenopausal women had their last menstrual cycle before achieving 50 years of age. The majority (87.4%) of the women breastfed, and of the 89

postmenopausal women, 71 (80.7%) did not receive hormonal therapy for climacteric symptoms (Table 1).

The TT genotype was more prevalent in controls (30.2%) than in women with breast cancer (14.9%) ($p=0.02$). There was no significant difference in prevalence of the CT genotype between cases (41.1%) and controls (53.0%) ($p=0.61$). The T allele frequency among controls was 50.8%, as contrasted to 41.4% in women with breast cancer ($p=0.06$) (Table 2).

Table 3 displays the distribution of the main epidemiological features of the women as related to C825T genotypes. The mean age at which the breast malignancy was diagnosed did not differ in relation to the C825T status of the women ($p=0.12$), even after categorizing women to age strata ($p=0.07$). The same was true for two other age-related risk factors for breast cancer: age at menarche ($p=0.07$) and age at menopause ($p=0.23$). Finally, we assessed the relationship between the BMI and C825T genotype: the mean BMI for women with CC, CT and TT genotypes were almost the same (nearly 27 kg/m²; $p=0.99$). After allotting women to clinically significant BMI strata (defining obesity), there was still no difference in BMI distribution as related to the SNP. The breast cancer risk for the majority (nearly 80%) of the women was less than 5% in 10 years, and was not related to the genotypes ($p=0.72$). The same was true for the lifetime breast cancer risk: almost 80% of the women had a lifetime risk of <10%, regardless of the C825T status ($p=0.84$) (Table 3).

Most (approximately 70%) of the tumors in this sample were larger than 2cm in diameter, but tumor size was not related to the C825T genotype ($p=0.91$). Most tumors (80%) were also high-grade, but this feature was not also

related to the SNP status ($p=0.54$). Neither the estrogen ($p=0.73$), progesterone ($p=0.46$) nor the HER2 ($p=0.90$) statuses bore a relation to the C825T status of the women. Most women had no involvement of the axilla, and the number of compromised lymph nodes was not related to the C825T genotype ($p=0.29$). As a consequence, most women were stages I and II, and stage distribution was not related to the SNP ($p= 0.41$) (Table 4).

Discussion

In our study, the genotype frequency of the C825T polymorphism was neither associated with patients' BMI nor to the most relevant clinical and pathological features of the breast malignancies. Contrary to our expectations, we also detected a higher prevalence of the TT genotype in women without breast cancer as compared to women diagnosed with the disease. Previous reports suggested that the C825T polymorphism may be linked to tumorigenesis, because the *GNB3* gene codifies protein G, which in turn regulates important steps of the cell cycle. The TT genotype has been shown to be more prevalent in colon, head and neck and other cancers (Lehnerdt et al., 2008; El Hindy et al., 2010 e Ofner et al., 2002). This is not contrast to the negative findings of the present study, because breast and colon cancers have different etiologies and molecular backgrounds (Krippel et al., 2004). Our study bears some importance because there are only two previous reports (Menzel et al., 2004; Krippel et al., 2004) that examined the association of the C825T genotype with breast cancer, neither of which found a positive relationship between the SNP and the prevalence of the breast malignancy. It is important to

mention that both these previous reports lack substantial information on the women's clinical and pathological characteristics, a deficiency which we successfully circumvented. Because of the complex phenotypical consequences of the *GNB3* polymorphism, its effect on cancer entities cannot be predicted and deserves research (Siffert et al., 1999).

The positive association between patients' BMI and homozygote TT SNP status has been detected in some studies (Chang et al., 2010; Dravecká et al., 2010). There are only speculative explanations for this association, most of these generically incriminating the *GNB3* G protein signal transducing activities. In our study, we were unable to detect a positive BMI trend in women with the TT genotype. However, we must emphasize that our study was not designed specifically to examine a relationship between BMI and the C825T polymorphism; according to our calculations, with the prevalence of the TT genotype of only 14% in a sample of 134 women, our study would be powered to be sensitive enough for a difference of approximately 25% in BMI among women who harbor the TT genotype. Other studies also did not find an association between the SNP with BMI either, which might have happened because of the ethnic effects (Krippel et al., 2004), since the T allele frequencies have been shown to vary substantially between populations (Potoczna et al., 2004; Souza et al., 2008). Importantly, nutritional disparities between populations may also hypothetically interfere with the penetrance of obesity-related genes (Souza et al., 2008).

Our study has the major strength of controlling for the main epidemiological and clinical characteristics of the women and their disease. The

G-protein exerts several biological activities, including hormone release control (Lee et al., 2009; Lee et al., 2008; Chang et al., 2010), cellular proliferation and differentiation (Chang et al., 2010). There are studies suggesting the relationship of the C825T status with metabolic abnormalities, ranging from lipidic disturbances to elevated blood pressure (Lee et al., 2009), which warrants the inclusion of clinical features strongly related to hormonal and metabolic status, such as age of menarche and menopause, parity and age at diagnosis in the multivariate study models. Taking all those variables into consideration, we did not detect any relation between neither the breast cancer related clinical features of the women with the SNP, nor the clinical and pathological configuration of the breast cancer.

Our study suffers from the limitation that we restricted our analysis to the C825T polymorphism and did not determine complete *GNB3* haplotypes. Also, although we have a complete clinical profile of the 134 breast cancer cases, our epidemiological data on the 129 controls is very limited, which prevented us from performing a deeper analysis of the possible relationships between the clinical and epidemiological features with the SNP status in women with and without breast cancer.

Collectively, our data indicate that the C825T polymorphism, although possibly implicated with several metabolic and carcinogenic pathways, bears no important relationship with either the risk neither for breast cancer nor to the presentation characteristics of the disease. These results expand previous findings on the relationship between the C825T polymorphism and breast cancer.

References

1. Chang HH, Gean PW, Chou CH, Yang YK, Tsai HC, Lu RB, et al. C825T polymorphism of the GNB3 gene on valproate-related metabolic abnormalities in bipolar disorder patients. *J Clin Psychopharmacol.* 2010;30(5):512-7.
2. Dravecká I, Lazúrová I, Habalová V. The prevalence of Gly972Arg and C825T polymorphisms in Slovak women with polycystic ovary syndrome and their relation to the metabolic syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(5):356-60.
3. El Hindy N, Adamzik M, Lambertz N, Bachmann HS, Worm K, Egensperger R, et al. Association of the GNB3 825T-allele with better survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(9):1423-9. Epub 2010 Feb 10.
4. Hayakawa T, Takamura T, Abe T, Kaneko S. Association of the C825T polymorphism of the G-protein B3 subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2007;56:44-48.
5. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, et al. The 825CT polymorphism of the G-protein beta-3

- subunit gene (GNB3) and breast cancer. *Cancer Letters*. 2004;206:59-62.
6. Lee JY, Kim SU, Cho JK, Woo SK, Kang HS. GNB3 C825T polymorphism and elevated blood pressure. *Int J Sports Med*. 2009;30(12):892-7.
 7. Lee YC, Lin HH, Wang CJ, Liu CC, Wu WJ, Huang CH, et al. The associations among GNB3 C825T polymorphism, erectile dysfunction, and related risk factors. *J Sex Med*. 2008;5(9):2061-8.
 8. Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Jahnke K, Lang S, et al. Association study of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism with disease progression and overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(11):3203-7.
 9. Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, Grünewald K, Haun M, et al. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *British Journal of Cancer*. 2004;90:1989-1994.
 10. Ofner D, Zitt M, Menzel H, Schmid KW, Frey U, Siffert W. The 825C allele of the gene GNB3 encoding the G-protein-3 subunit is associated with an increased risk for developing colorectal cancer. *Eur. J. Hum. Genet*. 2002;10:S105.

11. Potoczna N, Wertli M, Steffen R, Ricklin T, Lentjes KU, Horber FF. G protein polymorphisms do not predict weight loss and improvement of hypertension in severely obese patients. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2004;8:862-868.
12. R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, last access 10th December, 2010.
13. Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W. G protein $\beta 3$ gene: Structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension*. 2000;36:33-41.
14. Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, et al. Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension. *Nat Genet*. 1998;18:45-8.
15. Siffert W, Forster P, Jöckel KH, Mvere DA, Brinkmann B, Naber K, et al. Worldwide Ethnic Distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Nephrol*. 1999;10:1921-1930.
16. Souza RP, De Luca V, Muscettola G, Rosa DV, de Bartolomeis A, Romano Silva M, et al. Association of antipsychotic induced weight gain and body mass index with GNB3 gene: a meta-analysis. *Prog*

Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2008;12;32(8):1848-53. Epub
2008 Aug 28.

17. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model
incorporating familial and personal risk factors. *Statistics in Medicine*.
2004;23:1111-1130.

18. Vallar L. Oncogenic role of heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv*.
1996;27:325-338.

Table 1. Key reproductive features of the women

Characteristic	N (%)
Age at diagnosis	
<i>Mean (sd)</i>	56.8 (15.2)
<40	20 (14.9)
40-55	48 (35.8)
>55	66 (49.2)
Menopausal status	
Pre	45 (33.6)
Post	89 (66.4)
Parity	
No offspring	15 (11.2)
One	16 (11.9)
two or more	103 (76.9)
Age at menarche	
<12	55 (42.0)
≥12	76 (58.0)
Age at first pregnancy	
<35	108 (91.5)
≥35	10 (8.5)
Unknown	1
Age at menopause	
<50	62 (73.0)
≥ 50	23 (27.0)
Unknown	4
Breast feeding	
Yes	104 (87.4)
No	15 (12.6)
Hormone Therapy	
Yes	17 (19.3)
No	71 (80.7)
Unknown	1

Table 2. C825T genotype and allele frequencies of breast cancer patients and healthy controls

	Patients n(%)	Controls n(%)	<i>P</i>
CC	43 (32.1)	37 (28.7)	Ref
CT	71 (53.0)	53 (41.1)	0.61
TT	20 (14.9)	39 (30.2)	0.02
T allele frequency (%)	41.4	50.8	0.06

Generalized linear model

Table 3. Clinical features of the patients as related to the C825T genotype

	CC	CT	TT	P
Age at diagnosis	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Mean (SD)</i>	59.6 (16.1)	56.8 (14.3)	51.1 (15.6)	0.12
<40	7 (16.3)	7 (9.9)	6 (30)	
40-55	11 (25.6)	29 (40.8)	8 (40)	0.07
>55	25 (58.1)	35 (49.3)	6 (30)	
Age at menarche				
<i>Mean (SD)</i>	12.6 (1.7)	13.2 (1.8)	12.3 (1.2)	0.07
<12	20 (47.6)	45 (34.8)	11 (55)	
≥12	22 (52.4)	24 (65.2)	9 (45)	0.17
Age at menopause				
<i>Mean (SD)</i>	48.5 (5.0)	46.0 (5.7)	47.8 (5.4)	0.23
<50	9 (33.3)	37 (22.9)	3 (30)	
≥50	18 (66.7)	11 (77.1)	7 (70)	0.60
BMI				
<i>Mean (SD)</i>	27.2 (4.7)	27.1 (5.2)	27.3 (4.8)	0.99
<20 kg/m ²	2 (4.9)	5 (7.2)	1 (5)	
20 to 25 kg/m ²	13 (31.7)	22 (31.9)	7 (35)	0.98
>25 kg/m ²	26 (63.4)	42 (60.9)	12 (60)	
Breast cancer risk				
<i>10 years</i>				
<5%	35 (81.4)	55 (77.5)	17 (85)	
≥5%	8 (18.6)	16 (22.5)	3 (15)	0.72
<i>Lifetime</i>				
<10%	33 (76.7)	57 (80.3)	15 (75.0)	
≥10%	10 (23.3)	14 (19.7)	5 (25.0)	0.84

Table 4. Features of the breast malignancy as related to the C825T genotype

Disease features	CC		CT		TT		P
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Tumor size							
<1cm	1	(2.4)	4	(5.6)	0	(0)	
1 to 2cm	12	(29.3)	20	(28.2)	5	(25)	
>2cm	28	(68.3)	47	(66.2)	15	(75)	0.91
Histological grade							
1	1	(2.5)	3	(4.3)	1	(5)	0.54
2	9	(22.5)	8	(11.6)	2	(10)	
3	30	(75.0)	58	(84.1)	17	(85)	
Estrogen receptor							
Negative	11	(26.8)	23	(34.3)	7	(36)	0.73
Positive	30	(73.2)	40	(65.7)	13	(65)	
Progesterone receptor							
Negative	14	(34.1)	30	(45.5)	7	(36)	0.46
Positive	27	(65.9)	36	(54.5)	13	(65)	
HER-2							
Negative	28	(66.7)	42	(65.6)	12	(60)	0.90
Positive	14	(33.3)	22	(34.4)	8	(40)	
Status of the axilla							
Zero nodes	23	(53.5)	33	(46.5)	8	(40)	0.29
1 lymph node	9	(20.9)	12	(16.9)	3	(15)	
≥2 lymph nodes	11	(25.6)	26	(36.7)	9	(45)	
Disease Stage							
I-II	26	(61.9)	48	(67.6)	14	(73.7)	0.41
III	16	(38.1)	20	(28.2)	4	(21.1)	
IV	0	(0)	3	(4.2)	1	(5.3)	

5. Conclusões

1. A prevalência do polimorfismo (genótipo TT) em mulheres com câncer de mama foi de 14,9% e em mulheres sem o câncer de mama foi de 30,2%.
2. Não houve relação entre a presença do polimorfismo e o IMC das pacientes.
3. Os diferentes escores individuais de risco para o desenvolvimento da doença não apresentaram associação em relação à prevalência dos genótipos.
4. Os fatores clínicos do tumor, assim como as características reprodutivas, não estiveram relacionados com os genótipos do polimorfismo C825T.

6. Referências

1. INCA. Tipos de câncer. Mama. Instituto Nacional do Câncer, 2011.
Disponível em:
><http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 28 jan. 2011.
2. INCA. Estimativa 2010. Instituto Nacional do Câncer, 2010.
Disponível em:
<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5>. Acesso em: 13 mar. 2010.
3. Singletary ES. Rating the risk factors for breast cancer. *Annals of Surgery*. 2003; 4:474-482.
4. Cleary MP, Grossmann ME. Obesity and breast cancer: The Estrogen Connection. *Endocrinology*. 2009;150:2537-2542.
5. Conzen SD. Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol*. 2008;22:2215-2228.
6. Chompret A. Diagnostic génétique du cancer du sein et de l'ovaire héréditaire. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2003;32:101-119.

7. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2008; 9:321-45.
8. Freedman AN, Seminara D, Gail MH, Hartge P, Colditz GA, Ballard-Barbash R, Pfeiffer RM. Cancer risk prediction models: A workshop on development, evaluation, and application. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005;97:715-23.
9. Parmegiani G, Chen S, Iversen ES, Friebel TM, Finkelstein DM, Anton-Culver H, et al. Validity of models for predicting *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *Ann Intern Med*. 2007;147:441-50.
10. Euhus DM. Understanding mathematical models for breast cancer risk assessment and counseling. *The Breast Journal*. 2001;7(4):224-32.
11. Edlich RF, Winters KL, Lin KY. Breast Cancer and Ovarian Cancer Genetics. *Journal of long-term effects of medical implants*. 2005;15(5):533-545.
12. Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science*. 2004;306:640-3.

13. Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe III W, Kondrashov AS, Bork P. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet.* 2001;10:591-597.
14. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Preve.* 2001;8:843-854.
15. Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BA et al. Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res.* 2002;62:3052-3057.
16. Pierce BA. *Genética: um enfoque conceitual.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. cap.17:602-607.
17. Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W. G protein $\beta 3$ gene: Structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension.* 2000;36:33-41.
18. Online Mendelian Inheritance in Man, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/139130>>. Acesso em: 11 out. 2010.
19. Lee JY, Kim SU, Cho JK, Woo SK, Kang HS. GNB3 C825T polymorphism and elevated blood pressure. *Int J Sports Med.* 2009 Dec;30(12):892-7.

- 20.** Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein disease. *N Engl J Med.* 1999;340:1012-20.
- 21.** Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, et al. Association of a human G-protein β_3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet.* 1998;18:45-8.
- 22.** Hayakawa T, Takamura T, Abe T, Kaneko S. Association of the C825T polymorphism of the G-protein β_3 subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2007;56:44-48.
- 23.** Siffert W, Forster P, Jöckel KH, Mvere DA, Brinkmann B, Naber K, et al. Worldwide Ethnic Distribution of the G protein β_3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Nephrol.* 1999;10:1921-1930.
- 24.** Vallar L. Oncogenic role of heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv.* 1996;27:325-338.
- 25.** Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, Grünewald K, Haun M, et al. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *British Journal of Cancer.* 2004;90:1989-1994.

- 26.** Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Jahnke K, Lang S, et al. Association study of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism with disease progression and overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(11):3203-7.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e fatores de risco para câncer de mama entre mulheres tratadas em um centro de referência em oncologia mamária”

Pesquisadora responsável: Renata Gasparotto Paleari

HC: _____ RG: _____ Idade: _____

Endereço: _____ Tel:() _____

Existem dois tipos de cânceres de mama, um que é devido a defeitos nos genes das células do corpo e pode ser transmitido de pais para filhos e outro que ocorre naturalmente.

Eu, _____, que já tenho o câncer de mama, aceito colaborar como voluntária em um estudo que vai pesquisar estes defeitos genéticos que podem ser a causa da doença. Sei que estes dados poderão servir para conhecimentos futuros e influenciar nos tratamentos e outras opções médicas em pessoas com o risco de desenvolverem o câncer, inclusive membros de minha família, que poderão se beneficiar seguindo uma prevenção rigorosa.

Fui informada que, responderei a um questionário sobre meu estilo de vida (hábito de fumar, de consumir bebida alcoólica, ambiente em que vivo, etc), sobre questões reprodutivas (idade da primeira menstruação, número de gravidez, se amamentei ou não...) e sobre informações sobre meus parentes que tiveram ou têm câncer. Sei que se eu estiver sob tratamento quimioterápico não haverá necessidade de procedimento médico, pois minha

amostra sanguínea será reaproveitada daquela que já é colhida rotineiramente antes do procedimento e se não estou sob este tratamento será colhida uma amostra sanguínea. Fui informada também que, caso não queira participar ou desista de participar, isso não prejudicará meu atendimento atual ou futuro. Estou ciente de que os resultados não serão imediatos e que o material retirado poderá não ser completamente utilizado no estudo. Este material poderá ser descartado (jogado fora) ou armazenado para ser utilizado em futuras pesquisas, dependendo de minha autorização e da aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP (CEP/FCM/UNICAMP). Tenho direito a solicitar esclarecimentos de dúvidas sobre a pesquisa em qualquer momento, contatando a pesquisadora Renata Gasparotto Paleari pelo telefone (19) 3521 9524. Poderei também contatar o CEP/UNICAMP pelo telefone (19) 3521 8936.

Sim, aceito participar do estudo e **sim**, autorizo o armazenamento do material que sobrar.

Sim, aceito participar do estudo e **não** autorizo o armazenamento do material que sobrar.

Renata Gasparotto Paleari
Pesquisadora responsável

Paciente ou representante legal

Campinas, _____ de _____ de 20____.

7.2. Anexo 2 – Questionário

Número da ficha:

ESTILO DE VIDA

Ambiente: Rural Urbano

Escolaridade (anos letivos):

Estado civil: Solteira/Divorciada Viúva Casada

Peso: Altura:

Prática de exercícios: Sim Não Frequência:

Tipo aeróbico: Sim Não

Fumante: Sim Não No passado Passivo

Se atualmente, quantos cigarros por dia:

Se atualmente, por quanto tempo fuma:

Se, no passado, quantos cigarros por dia:

Se, no passado, há quanto tempo parou:

Consumo de álcool: Sim Não

Destilados: Sim Não

Fermentados: Sim Não

Quantas vezes por semana:

Quantas doses por dia que bebe:

Consumo de drogas: Sim Não Tipo:

Se atualmente, quantas vezes por dia:

Se atualmente, por quanto tempo usa:

Se, no passado, quantas vezes por dia:

Se, no passado, há quanto tempo parou:

Antitranspirante: Sim Não

Marca:

Tempo de uso:

Depilação axilar: Sim Não

Técnica: Lâmina Cera quente Cera fria Laser

HISTÓRIA REPRODUTIVA

1º ciclo menstrual:

Estado menopausal: Pré Pós

Natural Cirúrgica

Idade da menopausa:

Contraceptivos hormonais: Sim Não

Tempo de uso:

Nome:

Reposição hormonal: Sim Não

Tempo de uso:

Nome:

G P A FV

Idade da 1ª gravidez:

Amamentação: Sim Não

Histerectomia: Sim Não Data:

Ooforectomia: Sim Não Data:

Direito Esquerdo

HISTÓRICO ANTERIOR AO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER

Auto-exame: Sim Não Frequência:

Exame clínico: Sim Não Frequência:

Mamografia: Sim Não Frequência:

Idade da 1ª:

Data da mais recente:

Ultrassom: Sim Não

Frequência:

Idade da 1°:

Data do mais recente:

1° Câncer: Sim Não

Data do diagnóstico:

Outros cânceres: Tipo:

Data:

ESTUDO FAMILIAR

RAÇA/ETNIA

Paciente Caucasiano Negro Asiático Mulato Outra

Mãe Caucasiano Negro Asiático Mulato Outra

Pai Caucasiano Negro Asiático Mulato Outra

QUAL O PAÍS DE ORIGEM DOS ANCESTRAIS?

Avô materno:

Avô paterno:

Avó materna:

Avó paterna:

Sim

TEM PARENTES DESCENDENTES DE JUDEUS ASHKENAZI?

Não

HISTÓRIA FAMILIAR

	Familiar	Sexo	Câncer	Idade do Diagnóstico	Falecido
1		F/M			S/N
2		F/M			S/N
3		F/M			S/N
4		F/M			S/N
10		F/M			S/N

.....
Destaque aqui

Número da ficha:

Data da entrevista: _____

Nome: _____ HC: _____

Data de nascimento: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: () _____

7.3. Anexo 3 – Ficha para coleta de dados clínicos

DADOS DO CASO

Nome: _____	Número: _____
HC: _____	Data de nascimento: ____/____/____
Idade da paciente no diagnóstico: _____ anos	Data do diagnóstico: ____/____/____
Peso: _____	Altura: _____
Data da cirurgia: ____/____/____	
Recorrência familiar: 1. Não <input type="checkbox"/> 2. Sim <input type="checkbox"/>	
História pregressa de lesões mamárias:	
1. <input type="checkbox"/>	2. Hiperplas <input type="checkbox"/> 3. Hiperplasia atípica <input type="checkbox"/> 4. Carcinoma Lobular <i>in situ</i> <input type="checkbox"/>
História pregressa de tumores ovarianos:	
1. Não <input type="checkbox"/> 2. Benign <input type="checkbox"/> 3. Malign <input type="checkbox"/>	Tipo histológico: _____

DADOS DO TUMOR

Exame clínico: T: _____ N: _____ M: _____
Estágio tumoral: 1 I 2 IIa 3 IIb 4 IIc 5 IIIa 6 IIIb 7 IIIc 8 IV
Lado: 1 Direito 2 Esquerdo 3 Bilateral
Quadrante: 1 QSE 2 QSI 3 QII 4 QIE 5 QC
Grau histológico: _____ Grau nuclear (parte invasiva): _____
Tamanho do tumor : _____ cm
Estado da axila: 1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Positivo <input type="checkbox"/>
Linfonodos acometidos: 1 Um 2 Dois 3 Três ou mais
Este tumor é uma recidiva? 1. Não <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 2. Sim
Data do diagnóstico de recidiva: ____/____/____ a mesma mama b mama contralateral
Existe componente <i>in situ</i> ? 1. Não <input type="checkbox"/> 2. Sim <input type="checkbox"/>
Extensão: _____ cm Grau nuclear: _____
Tipo(s): _____

RECEPTORES

Estrógeno: 1. Negativo 2. Positivo % de células com receptor positivo ___

Progesterona: 1. Negativo 2. Positivo % de células com receptor positivo ___

C-erbB2: 1. Negativo 2. Positivo score: _____

Outros receptores: _____

EXAMES DIAGNÓSTICOS

Mamografia: Tamanho do tumor: _____ BIRADS mamográfico: _____

USG: _____

Radiografia de tórax:

USG abdominal:

Cintilografia óssea:

CONDUTA PÓS-CIRÚRGICA

Quimioterapia? 1. Não 2. Sim

Tipo: _____

Radioterapia? 1. Não 2. Sim

Especificar: _____

Hormonioterapia? 1. Não 2. Sim

Especificar: _____

Óbito por motivo da doença? 1. Não 2. Sim Data de óbito: ___/___/___

7.4. Anexo 4 – Parecer do CEP

7.4.1. Parecer projeto inicial



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 23/12/10.
(Grupo II)

2ª VIA

PARECER CEP: N° 901/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0696.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “MUTAÇÕES NOS GENES BRCA1 E BRCA2 E FATORES DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA ENTRE MULHERES TRATADAS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA MAMÁRIA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Gasparotto Paleari.

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/10/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 09/12/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Determinar a prevalência e associação de mutações em BRCA1 e em BRCA2 em mulheres com câncer de mama com o escore de risco familiar e fatores clínicos e epidemiológicos relacionados à neoplasia.

III - SUMÁRIO

O estudo do tipo corte transversal será realizado com uma amostra de 150 mulheres, com câncer de mama, admitidas no Serviço de Mastologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Unicamp. Será aplicado um questionário para buscar dados sócio-econômicos, epidemiológicos, clínicos e de história familiar para a doença. A partir destes dados, serão calculados escores de risco para câncer de mama através do software IBIS Breast Cancer Risk Evaluation Tool. Amostras sanguíneas serão utilizadas para a detecção das mutações. O DNA será extraído dos leucócitos das amostras utilizando-se o Kit Wizard Genomic (Promega®), de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes. Os genes serão sequenciados a fim de se encontrar mutações e/ou polimorfismos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

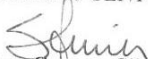
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de outubro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

7.4.2. Parecer do adendo para inclusão do polimorfismo C825T



CEP, 27/07/10.
(PARECER CEP: N° 901/2009)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “MUTAÇÕES NOS GENES BRCA1 E BRCA2 E FATORES DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA ENTRE MULHERES TRATADAS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA MAMÁRIA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Gasparotto Paleari

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui do polimorfismo C825T nas amostras coletadas, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

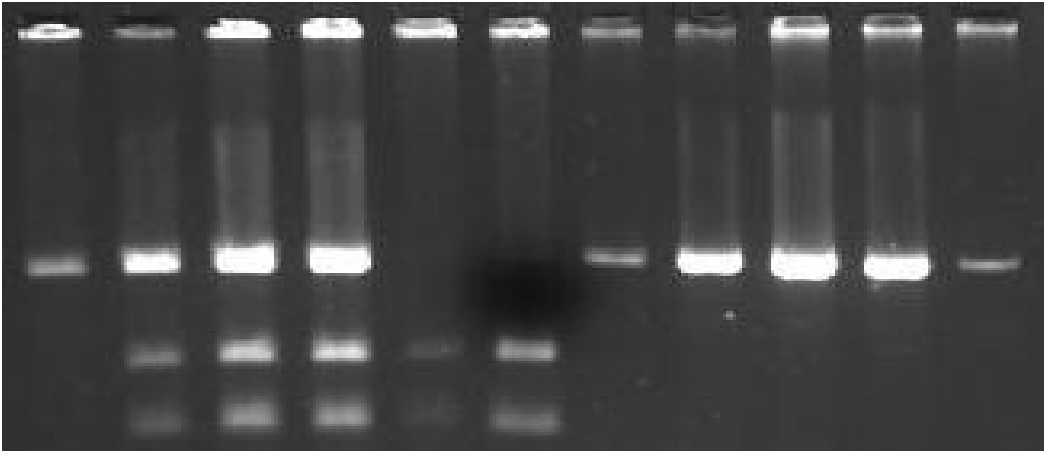
Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de julho de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187

7.5. Anexo 5 – Fotografia da eletroforese



Genótipo TT : fragmentos de 268pb (produto não clivado). Visualiza-se somente uma banda superior.

Genótipo CT : fragmentos de 268pb (alelo T), 152 e 116pb (resultantes da quebra do alelo C). Visualiza-se três bandas.

Genótipo CC : fragmentos de 152 e 116pb (resultantes da quebra do alelo C). Visualiza-se duas bandas inferiores.

7.6. Anexo 6 – Tela de inserção de dados do *Software* IBIS

Personal factors

Woman's age: Menarche:

Height (m): Weight (kg):

Measurements: Metric: Imperial:

Nulliparous: Parous: Age First Child: Unknown:

Hyperplasia (without atypia): Atypical hyperplasia: LCIS: Ovarian cancer:

Premenopausal: Perimenopausal: Postmenopausal: No information: Age at menopause:

Patient id: Patient no.: Calculate Risk

View Family History

HRT use: Never: 5 or more years ago: Less than 5 years ago: Current user: Length of use (years):

Mother: Ovarian: Bilateral: Breast cancer: Age:

Sisters: Number: Ovarian: Bilateral: Breast cancer: Age:

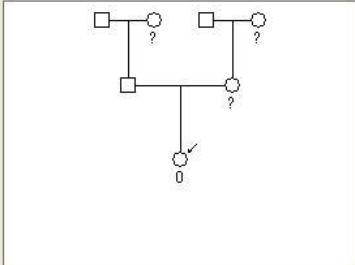
Ashkenazi inheritance:

Half Sisters Affected cousins Affected Nieces Genetic Testing

Paternal Gran: Ovarian: Breast cancer: Age:

Maternal Gran: Ovarian: Breast cancer: Age:

Show start up screen



Paternal aunts: Number: Ovarian: Bilateral: Breast cancer: Age:

Maternal aunts: Number: Ovarian: Bilateral: Breast cancer: Age:

Daughters: Number: Ovarian: Bilateral: Breast cancer: Age: