



LUCIANA MONTES REZENDE

POLIMORFISMOS NOS GENES *ESR1*, *ESR2* E *MTHFR* COMO FATORES
DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO

CAMPINAS – SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

LUCIANA MONTES REZENDE

POLIMORFISMOS NOS GENES *ESR1*, *ESR2* E *MTHFR* COMO FATORES
DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas,
área de concentração Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR(A): Prof^a Dr^a Carmen Sílvia Bertuzzo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO(A)
LUCIANA MONTES REZENDE, E ORIENTADO PELO(A)
PROF^A. DR^A CARMEN SÍLVIA BERTUZZO.

Assinatura do orientador

CAMPINAS-SP

2015

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R339p Rezende, Luciana Montes, 1988-
Polimorfismos nos genes *ESR1*, *ESR2* e *MTHFR* como fatores de risco do
câncer de mama esporádico / Luciana Montes Rezende. – Campinas, SP : [s.n.],
2015.

Orientador: Carmen Sílvia Bertuzzo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Genes modificadores. 2. Neoplasias. 3. Mama. 4. Receptores estrogênicos.
5. Folatos. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia, 1963-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Polymorphisms in genes *ESR1*, *ESR2* e *MTHFR* as sporadic breast
cancer risk factors

Palavras-chave em inglês:

Modifier genes

Neoplasm

Breast

Receptors, Estrogen

Folates

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carmen Sílvia Bertuzzo [Orientador]

Marilda de Souza Gonçalves

Mônica Barbosa de Melo

Data de defesa: 24-02-2015

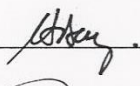
Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

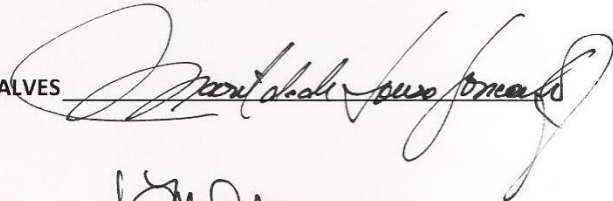
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

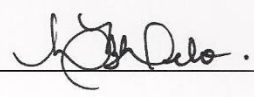
LUCIANA MONTES REZENDE

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO 

2. PROF(A). DR(A). MARILDA DE SOUZA GONÇALVES 

3. PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO 

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 24 de fevereiro de 2015.

RESUMO

O Câncer de Mama (CM) é a forma de neoplasia mais diagnosticada e a principal causa de morte por câncer em várias regiões do mundo, sendo a maior parte CM esporádico. O estilo de vida reprodutivo representa importante fator de risco relacionado à exposição ao estrogênio durante a vida, visto que o hormônio é responsável por estimular a proliferação celular na mama. Por outro lado, a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) regula o balanço celular entre a metilação e a síntese de ácidos nucleicos. Polimorfismos nos genes dos receptores de estrogênio (*ESR1* e *ESR2*) e do metabolismo do folato (*MTHFR*) têm sido associados ao risco de CM em diferentes populações. **Objetivos:** Avaliar a associação entre CM esporádico e os polimorfismos c.2014G>A (*ESR1*), c.1730G>A (*ESR2*), c.677C>T e c.1298A>C (*MTHFR*), incluindo as variáveis clínicas. **Material e Métodos:** Foram selecionadas 253 amostras de DNA de mulheres com CM esporádico do Laboratório de Genética Molecular do Câncer (FCM-Unicamp) e 257 controles femininos com idade superior a 50 anos e sem história familiar para CM ou câncer de ovário. As amostras foram genotipadas por RFLP-PCR. Foram incluídas variáveis clínicas relacionadas ao indivíduo, aos tumores e ao estilo de vida reprodutivo. Para a análise estatística, foi utilizado o *software* SPSS vs21.0, empregado o teste χ^2 para a distribuição dos polimorfismos e, quando observada diferença no percentual destes, foi calculada a Razão de Prevalência. **Resultados:** Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação à ocorrência de CM para os polimorfismos: c.2014G>A ($p=0,281$), c.1730G>A ($p=0,241$), c.677C>T ($p=0,443$) e c.1298A>C ($p=0,805$). Ao associar os genótipos às variáveis clínicas, o alelo A (c.2014G>A) foi menos prevalente em tumores com expressão do receptor de estrogênio (RE positivos) (OR=0,469; 95% IC=0,262–0,841) e mais prevalente no estadió 0 em relação aos demais (OR=3,911; 95% IC=1,394–10,97), enquanto no genótipo GA teve expressão diminuída de RE e no GG, maior expressão de receptor de estrogênio (RP). Para o c.1730G>A, o genótipo GA foi mais prevalente entre as mulheres que amamentaram (OR=2,257; 95% IC=1,254–4,061), menos prevalente em hipertensão arterial sistêmica (HAS) (OR=0,578; 95% IC=0,339–0,987) e conferiu proteção do estadió 0 em relação aos demais (OR=4,383; 95% IC=1,606–11,96).

Na análise do haplótipo c.2014G>A/c.1730G>A, GG/GG foi menos prevalente entre as mulheres que amamentaram (OR=0,525; 95% IC=0,298–0,924) e teve maior expressão de RP. Para os polimorfismos no *MTHFR*, o genótipo CC (c.677C>T) representou um fator de risco para metástases a distância (OR=5,311; 95% IC=1,124–25,09) e teve menor expressão de RE, enquanto o genótipo AA (c.1298A>C) foi menos prevalente no estadio 0 em relação aos demais (OR=0,034; 95% IC=0,067–0,669) e apresentou maior expressão de RE. Na análise do haplótipo c.677C>T/c.1298A>C, o CC/AA foi associado ao uso de contraceptivo hormonal (OR=3,671; 95% IC=1,344–10,03) e HAS (OR=1,979; 95% IC=1,036–3,782); e o CT/AC foi menos prevalente no carcinoma invasivo de tipo não especial (NST) (OR=0,032; 95% IC=0,243–0,918) e conferiu proteção do estadio 0 em relação aos demais (OR=3,476; 95% IC=1,341–10,47). **Conclusões:** Os polimorfismos parecem não alterar o risco para o desenvolvimento de CM esporádico, no entanto, podem estar associados à sua gravidade.

Palavras-chave: genes modificadores, neoplasias, mama, receptores estrogênicos, folatos.

ABSTRACT

*The Breast Cancer (BC) is the most frequently diagnosed form of cancer and the main cause of cancer death in many parts of the worldwide. The reproductive lifestyle is an important risk factor related to exposure to estrogen during life, as the hormone is responsible for stimulating cell proliferation in the breast. On the other hand, the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) regulates cell balance between synthesis and methylation of nucleic acids. Polymorphisms in the genes of the estrogen receptor (ESR1 and ESR2) and folate metabolism (MTHFR) have been associated with risk of breast cancer in different populations. **Objectives:** To evaluate the association between sporadic CM and polymorphisms c.2014G>A (ESR1), c.1730G>A (ESR2), c.677C>T and c.1298A>C (MTHFR), including clinical variables. **Material and Methods:** We studied 253 DNA samples from women with sporadic CM Molecular Genetics of Cancer Laboratory (FCMUnicamp) and 257 female controls over the age of 50 and without family history of CM or ovarian cancer. The samples were genotyped by PCR-RFLP. Clinical variables were included related to the individual, to tumors and reproductive lifestyle. For statistical analysis, SPSS software was used vs21.0, the employee χ^2 test for the distribution of polymorphisms and when significant differences in the percentage of these, we calculated the odds ratio. **Results:** There was no significant difference between groups in the occurrence of CM for the polymorphisms: c.2014G>A ($p=0.281$), c.1730G>A ($p=0.241$), c.677C>T ($p=0.443$) and c.1298A>C ($p=0.805$). By associating genotypes to clinical variables, the A allele (c.2014G>A) was less prevalent in tumors positive RE (OR=0.469; 95% CI = 0.262 to 0.841) and more prevalent in stage 0 compared to the other (OR=3.911; 95% CI=1.394 to 10.97), while the GA genotype had lower expression of RE and GG, most PR expression. For c.1730G>A, the GA genotype was more prevalent among women who breastfed (OR=2.257; 95% CI=1.254 to 4.061), less prevalent in hypertension (OR=0.578; 95% CI=0.339 to 0.987) and conferred protection stage 0 in relation to others (OR=4.383; 95% CI=1.606 to 11.96). In the haplotype analysis c.2014G>A/c.1730G>A, the GG/GG was less prevalent among those who breastfed (OR=0.525; 95% CI=0.298 to 0.924) and had higher PR expression. For polymorphisms in MTHFR, the CC genotype*

(c.677C>T) was a risk factor for distant metastasis (OR=5.311; 95% CI=1.124 to 25.09) and had lower expression of ER, while the genotype AA (c.1298A>C) was less prevalent in stage 0 in relation to others (OR=0.034; 95% CI=0.067 to 0.669) and showed a higher expression of RE. In the haplotype analysis c.677C>T/c.1298A>C, CC / AA was associated with hormonal contraceptive use (OR=3.671, 95% CI=1.344 to 10.03) and hypertension (OR=1.979; 95 % CI=1.036 to 3.782); and the CT/AC was less prevalent in invasive carcinoma NST (OR=0.032; 95% CI=0.243 to 0.918) and conferred protection stage 0 in relation to others (OR=3.476; 95% CI=1.341 to 10.47). **Conclusions:** The polymorphisms do not appear to alter the risk for developing sporadic BC, however, may be associated with its severity.

Keywords: modifier genes; neoplasm; breast; receptors, estrogen; folates.

SUMÁRIO

Dedicatória	xiii
Agradecimento	xv
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas	xix
Lista de abreviaturas	xxv
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer	1
1.2. Câncer de mama	2
1.2.1. Tipos histológicos	3
1.2.2. Grau histológico e estadiamento	6
1.2.3. Subtipos moleculares	9
1.2.4. Fatores de risco	11
1.3. Genes dos receptores de estrógeno	12
1.4. Gene <i>MTHFR</i>	16
1.4.1. Metilação	19
2.JUSTIFICATIVA	21
3.OBJETIVOS	23
3.1. Gerais	23
3.2. Específicos	23
4.MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Casuística	25
4.2. Técnica	25
4.2.1. Extração de DNA de sangue periférico	25
4.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
4.2.3. Digestão com enzimas de restrição e genotipagem dos SNPs	28
4.3. Variáveis clínicas	32
4.4. Análise estatística	32

5.RESULTADOS	35
5.1. Caracterização da amostra	36
5.2. Polimorfismos nos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i>	40
5.2.1. Análise de combinação dos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i>	49
5.3. Polimorfismos no gene <i>MTHFR</i>	50
5.3.1 Análise do haplótipo <i>c.677C>T</i> e <i>c.1298A>C</i>	59
5.4. Interação gênica	61
6.DISSCUSSÃO	63
6.1. Caracterização da amostra	63
6.2. Polimorfismos <i>versus</i> risco para CM	64
6.3. Polimorfismos nos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> <i>versus</i> variáveis clínicas	66
6.4. Polimorfismos no gene <i>MTHFR</i> <i>versus</i> variáveis clínicas	69
7.CONCLUSÕES	73
8.REFERÊNCIAS	75
ANEXO 1	
Parecer do Comitê de Ética	85
ANEXO 2	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	89

***P**rimero, aos que amo imensamente e que com carinho, confiança e incentivo me possibilitaram essa conquista: meu pai Aguinaldo, minha mãe Dorothi e meus irmãos Rodrigo e Isadora. Segundo, aos meus amigos e colegas de trabalho que contribuíram de todas as formas, inclusive trazendo alegria aos meus dias.*

AGRADECIMENTOS

À Carmen Sílvia Bertuzzo e Fernando Augusto de Lima Marson pela alegria, carinho e atenção durante a realização desse trabalho. Mais do que orientadora e co-orientador, são amigos que levarei para sempre.

À banca examinadora, Prof^a Dr^a Marilda de Souza Gonçalves e Prof^a Dr^a Mônica Barbosa de Melo, pelas correções e sugestões que contribuíram para o enriquecimento desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Carmen Sílvia Passos Lima pela colaboração na obtenção das amostras e dados clínicos das pacientes.

Aos funcionários do Laboratório de Genética Molecular pela disposição e cuidado dedicados à pesquisa. Em especial, à Dr^a Luciana Cardoso Bonadia que contribuiu não só auxiliando nas práticas laboratoriais, mas também com sugestões riquíssimas no Exame de Qualificação dessa dissertação, juntamente com o pesquisador Dr Fábio Rossi Torres.

Aos alunos do Departamento de Genética Médica e usuários do Laboratório de Genética Molecular por compartilharem conhecimentos, além de proporcionarem o melhor ambiente de trabalho. Não irei citar nomes, mas algumas pessoas foram individualmente especiais e se tornaram amigos que levarei para a eternidade.

Às minhas irmãs “postiças” Fernanda Souza, Ana Paula dos Santos e Stephanie Villa-Nova pela amizade, paciência e companheirismo. Por dividir um lar, ouvirem meus desabafos e aguentarem minhas manias.

Aos meus pais, Aguinaldo e Dorothi, e irmãos, Rodrigo e Isadora, por serem as peças principais na minha vida. Todo o amor, carinho, confiança e apoio depositados foram essenciais no caminho até aqui. Não é fácil administrar a saudade e a distância, mas leva-

los em meu coração me dá forças para seguir em frente. Tenho sorte por tê-los em minha vida!

Àqueles que não foram citados, e que foram igualmente importantes para a realização desse projeto, meu sincero agradecimento.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de câncer, em relação à localização primária, no mundo e no Brasil.....	2
Figura 2. Tipos histológicos de CM (exemplos).....	6
Figura 3. Representação dos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> e respectivos polimorfismos.....	13
Figura 4. Representação estrutural das isoformas humanas dos receptores RE α e RE β	14
Figura 5. Representação do gene <i>MTHFR</i> e polimorfismos.....	16
Figura 6. Esquema simplificado do processo de metilação do DNA.....	17
Figura 7. Análise do polimorfismo c.2014G>A no gene <i>ESR1</i> em gel de agarose 2%.....	30
Figura 8. Análise do polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> em gel de agarose 2%.....	30
Figura 9. Análise do polimorfismo c.677C>T no gene <i>MTHFR</i> em gel de poliacrilamida a 12%.....	31
Figura 10. Análise do polimorfismo c.1298A>C no gene <i>MTHFR</i> em gel de poliacrilamida a 14%.....	31
Figura 11. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.2014G>A.....	42

Figura 12. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RP em função dos genótipos para o SNP c.2014G>A.....	42
Figura 13. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RP em função do grupo GG/GG	50
Figura 14. Porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.677C>T.....	54
Figura 15. Porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.1298A>C.....	54
Figura 16. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.1298A>C (AA vs AC+CC).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Carcinomas invasivos da mama (exceto carcinoma microinvasivo e lesões papilares invasivas).....	5
Tabela 2. Classificação TNM para tumores mamários.....	8
Tabela 3. Classificação por estadios clínicos para tumores mamários.....	8
Tabela 4. Classificação segundo a expressão de receptores hormonais e de proliferação celular.....	9
Tabela 5. Concentração dos reagentes utilizados na PCR para os polimorfismos nos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> e <i>MTHFR</i>	27
Tabela 6. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas PCRs.....	28
Tabela 7. Condições das reações de digestão para os polimorfismos nos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> e <i>MTHFR</i>	29
Tabela 8. Fragmentos gerados pela digestão enzimática e análise dos polimorfismos.....	29
Tabela 9. Agrupamentos dos genótipos para análise dos polimorfismos nos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> e <i>MTHFR</i>	33
Tabela 10. Variáveis clínicas em que houve agrupamento dos dados para a associação com os polimorfismos.....	34

Tabela 11. Distribuição genotípica dos polimorfismos c.2014G>A no gene <i>ESR1</i> , c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> , c.677C>T e c.1298A>C no gene <i>MTHFR</i>	35
Tabela 12. Caracterização geral dos pacientes com CM que compõem a casuística.....	37
Tabela 13. Caracterização das pacientes quanto ao estilo de vida reprodutivo.....	38
Tabela 14. Características gerais dos tumores.....	39
Tabela 15. Classificação TNM dos tumores e estadió clínico.....	40
Tabela 16. Polimorfismo c.2014G>A no gene <i>ESR1</i> versus o status de expressão do RE.....	41
Tabela 17. Polimorfismo c.2014G>A no gene <i>ESR1</i> versus o status de expressão do RE, considerando o agrupamento dos genótipos.....	41
Tabela 18. Polimorfismo c.2014G>A no gene <i>ESR1</i> versus estadiamento do CM, considerando o agrupamento dos genótipos.....	41
Tabela 19. Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> versus o status de lactação.....	43
Tabela 20. Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> versus o status de lactação, com o genótipo GG em evidência.....	43
Tabela 21. Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> versus o status de lactação, com o genótipo GA em evidência.....	43
Tabela 22. Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> versus a presença ou ausência de HAS.....	44

Tabela 23. Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> versus a presença ou ausência de HAS, considerando o agrupamento dos genótipos.....	44
Tabela 24. Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i> versus estadiamento do CM, considerando o agrupamento dos genótipos.....	45
Tabela 25. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.2014G>A e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.....	46
Tabela 26. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1730G>A e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.....	47
Tabela 27. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.2014G>A e as variáveis clínicas numéricas, utilizando os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.....	48
Tabela 28. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1730G>A e as variáveis clínicas numéricas, utilizando o teste Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.....	48
Tabela 29. Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos c.2014G>A (gene <i>ESR1</i>) e c.1730G>A (gene <i>ESR2</i>).....	49
Tabela 30. Associação do haplótipo GG/GG (c.2014G>A e c.1730G>A) e lactação entre as pacientes.....	50
Tabela 31. Polimorfismo c.677C>T no gene <i>MTHFR</i> versus a presença ou ausência de metástase à distância (M), evidenciando o genótipo CC.....	51

Tabela 32. Polimorfismo c.677C>T no gene <i>MTHFR</i> versus a presença ou ausência de metástase à distância, evidenciando o genótipo CT.....	51
Tabela 33. Polimorfismo c.677C>T no gene <i>MTHFR</i> versus estadiamento do CM, considerando o agrupamento dos genótipos.....	52
Tabela 34. Polimorfismo c.1298A>C no gene <i>MTHFR</i> versus estadiamento do CM.....	52
Tabela 35. Polimorfismo c.1298C>T no gene <i>MTHFR</i> versus estadiamento do CM, evidenciando o genótipo AA.....	53
Tabela 36. Polimorfismo c.1298C>T no gene <i>MTHFR</i> versus estadiamento do CM, evidenciando o genótipo AC.....	53
Tabela 37. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.677C>T e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.....	56
Tabela 38. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1298A>C e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.....	57
Tabela 39. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.677C>T e as variáveis clínicas numéricas, utilizando o teste Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.....	58
Tabela 40. p-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1298A>C e as variáveis clínicas numéricas, utilizando o teste Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.....	58

Tabela 41. Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos c.677C>T e c.1298A>C no gene <i>MTHFR</i>	59
Tabela 42. Associação do haplótipo CC/AA (c.677C>T e c.1298A>C) e o uso de contraceptivo hormonal.....	60
Tabela 43. Associação do haplótipo CC/AA (c.677C>T e c.1298A>C) e HAS.....	60
Tabela 44. Associação do haplótipo CC/AA (c.677C>T e c.1298A>C) e o estadiamento do CM.....	60
Tabela 45. Associação do haplótipo CT/AC (c.677C>T e c.1298A>C) e o tipo histológico de CM.....	61
Tabela 46. Associação do haplótipo CT/AC (c.677C>T e c.1298A>C) e o estadiamento do CM.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)₂SO₄	sulfato de amônia
ACOH	anticoncepcional hormonal
AF-1	<i>activation function 1</i>
AF-2	<i>activation function 2</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA1	Proteína BRCA1
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
CLI	carcinoma lobular invasivo
CM	câncer de mama
CpG	citossinas que precedem guaninas
DBD	<i>domain binding DNA</i>
DM	diabete melito
DNMTs	DNA metiltransferases
dNTP	desoxirribonucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EREs	elementos de resposta ao estrógeno
ESR1	<i>Estrogen Receptor 1</i>
ESR2	<i>Estrogen Receptor 2</i>
FAD	<i>flavine-adenine dinucleotide</i>
GH	grau histológico
GN	grau nuclear
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HCl	ácido clorídrico
HER2	<i>Human Epidermal Growth-Factor Receptor 2</i>
IDC	<i>invasive ductal carcinoma</i>
IHQ	imunohistoquímica
IMC	índice de massa corpórea
KCl	cloreto de potássio

LBD	<i>ligand-binding domain</i>
M	metástase à distância
MDR	<i>multifactor dimensionality reduction</i>
MgCl₂	cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
MTHFR	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i>
MTHFR	enzima metilenetetrahidrofolato redutase
MTR	<i>Methionine Synthetase</i>
N	metástase em linfonodos regionais
NaCl	cloreto de sódio
NST	<i>no special type</i>
p53	proteína p 53
PCR	<i>polimerase chain reation</i>
RE	receptor de estrógeno
REα	receptor de estrógeno alpha
REβ	receptor de estrógeno beta
RNA	ácido ribonucleico
RP	receptor de progesterona
RFLP-PCR	<i>restriction fragments length polymorphisms-PCR</i>
SAM	s-adenosilmetionina
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPSS	<i>statistical package for the social sciences</i>
T	tamanho
TDLU	<i>terminal ducts lobular units</i>
THF	tetrahidrofolato
TRH	terapia de reposição hormonal
TYMS	<i>Tymidilate Synthetase</i>
UTR	<i>untranslated regions</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O termo “câncer” e os sinônimos “neoplasia” e “tumor” referem-se ao conjunto de doenças causadas por proliferação celular anormal, autônoma, com metabolismo diferenciado que tende à perpetuação, causando efeitos prejudiciais ao organismo.¹ Trata-se de um grupo de doenças complexas com características heterogêneas e de etiologia multifatorial que afetam pessoas no mundo todo, representando um grave problema de saúde pública.²

Estima-se que em 2012 tenham sido registrados no mundo, aproximadamente, 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos relacionados à doença. Além disso, no mesmo ano existiriam 32,6 milhões de indivíduos com idade superior a 15 anos com diagnóstico realizado entre 2007 e 2012. Mais da metade de todos os casos (56,8%) e óbitos (64,9%) ocorreram em países em desenvolvimento. O câncer de pulmão foi o mais frequente, sem considerar o sexo, representando 13% do total de casos e 19,4% do total de mortes por câncer.³

No Brasil, segundo estimativas, foram registrados 437.600 casos novos e 224.700 mortes por câncer no ano de 2012. O tumor de próstata foi o mais incidente (16,6%) seguido pelo de mama feminino (15,4%) e de pulmão (7,8%),³ o que difere das estimativas mundiais como apresentado na **Figura 1**. Para o ano de 2014, estima-se que a incidência tenha aumentado para aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no Brasil, incluindo neoplasias de pele não melanoma.⁴

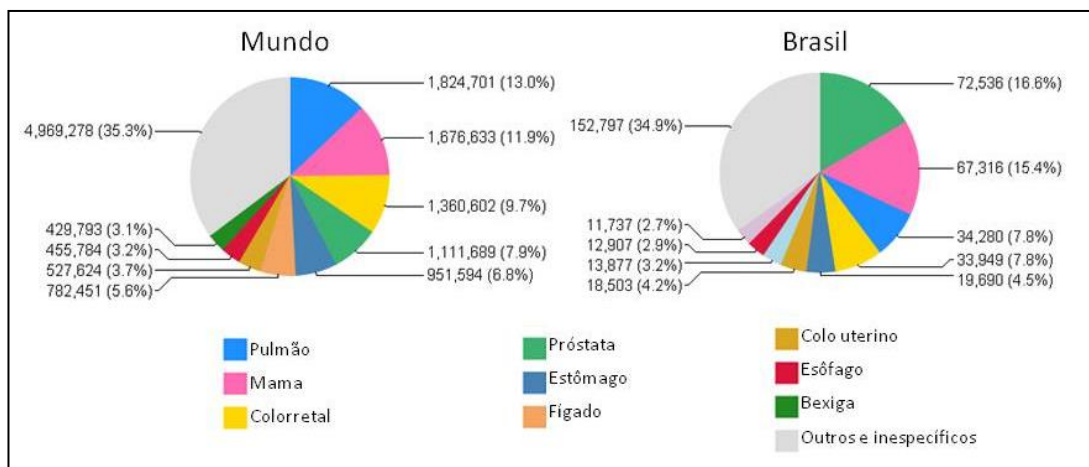


Figura 1. Incidência de câncer, em relação à localização primária, no mundo e no Brasil. [Adaptado de Ferlay J et al. (2014)]³

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é a forma de neoplasia mais diagnosticada nas mulheres em várias regiões do mundo.^{5,6} No ano de 2012 foram registrados 1,7 milhão de casos novos e contabilizadas 6,3 milhões de mulheres vivas com diagnóstico realizado nos cinco anos anteriores. Em comparação às estimativas do ano de 2008, houve aumento de 20% na incidência e de 14% na mortalidade, totalizando 522 mil óbitos pela doença.³ Atualmente, o CM representa um em cada quatro tumores em mulheres. As maiores taxas de incidência do CM são observadas em países desenvolvidos.^{2,3}

Estima-se que tenham sido registrados no Brasil 67.316 casos novos de CM no ano de 2012, representando 31,4% de todas as neoplasias femininas diagnosticadas. Enquanto o número de óbitos pela doença seria de, aproximadamente, 16.400 (15,8% do total de mortes femininas por câncer).³ Para o ano de 2014 haveria redução na incidência para 57.120 casos novos, com risco estimado de 56,09 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar o câncer de pele não melanoma, o CM representa o tumor de maior incidência nas mulheres em todas as regiões brasileiras, exceto na região norte do país onde o câncer cervical é o mais incidente seguido pelo CM.⁴

O CM é uma doença complexa que varia em fatores de risco, história natural, padrões histológicos, padrões moleculares e resposta ao tratamento.⁷ Em mulheres com idade inferior a 25 anos, a prevalência é de 10 casos/100.000, aumentando em 100 vezes na faixa etária a partir de 45 anos, sendo mais comum na presença de história familiar para a doença, comparado à população geral.⁸

1.2.1. Tipos histológicos

Os tumores mamários podem ter a sua origem de células epiteliais, mioepiteliais, mesenquimais e fibroepiteliais, sendo os carcinomas invasivos os mais comuns.⁹

O carcinoma invasivo representa um grupo de neoplasias malignas caracterizadas por invasão de tecidos adjacentes e tendência a formar metástases em sítios distantes. Supõe-se que se originem do epitélio do parênquima mamário, particularmente das células das unidades ducto-lobular terminal (TDLU, i.e. *terminal duct lobular units*).⁹ Aproximadamente 80% dos casos estão relacionados ao carcinoma ductal *in situ*,¹⁰ sendo o mais incidente o carcinoma invasivo de tipo não especial (NST, i.e. *no special type*), identificado na rotina médica como carcinoma ductal invasivo (IDC, i.e. *invasive ductal carcinoma*), e compreende 70% dos casos de CM.^{11,12}

São classificados como carcinomas invasivos NST todos aqueles ductais sem características específicas que possam diferenciá-los em outros tipos “especiais”, constituindo um grupo heterogêneo para os aspectos macroscópicos e histológicos.^{9,11,12} Podem apresentar tanto arquitetura com células em cordas, cachos ou trabéculas, quanto padrão infiltrativo. O citoplasma é abundante e eosinofílico, enquanto o núcleo varia em regular, uniforme ou altamente pleomórfico, com nucléolos múltiplos e proeminentes. Ao exame macroscópico, variam em tamanho (10 a 100 mm) e configuração (irregular, estrelado ou nodular), podendo ser firmes ou duros à palpação.⁹ Há diferenças, inclusive, no painel de expressão de genes relacionados à proliferação, junção celular, receptores

hormonais e de fatores de crescimento. Por esses motivos, é amplo o espectro prognóstico e estratégias de tratamento nesta categoria de CM.^{11,13,14}

Dentre as variantes morfológicas raras de carcinoma invasivo NST, encontram-se o carcinoma: (i) pleomórfico; (ii) com células gigantes tipo osteoclasto; (iii) de características coriocarcinomatosas; (iv) de características melanóticas; e (v) tipo misto.¹¹

Em contrapartida, os tipos especiais de carcinomas invasivos apresentam características biológicas e clínicas homogêneas, permitindo a classificação em grupos específicos. São mais de 20 tipos (**Tabela 1**) diferenciados por critérios histológicos e que, normalmente, comportam apenas um subtipo molecular consistente com o prognóstico da doença. Destes, o carcinoma lobular invasivo (CLI) apresenta maior prevalência, representando aproximadamente 15% dos casos de CM.^{9,11,15}

Como a maioria dos tumores são categorizados como carcinomas invasivos NST, a diferenciação histológica não é suficiente para prever o prognóstico e definir o melhor tratamento. Dessa forma, na rotina clínica, os tumores são classificados segundo o grau histológico,¹⁶ estadiamento¹⁷ e expressão de receptores hormonais e de proliferação celular.^{10,13}

Tabela 1. Carcinomas invasivos da mama (exceto carcinoma microinvasivo e lesões papilares invasivas).

Tumor
Carcinoma invasivo NST
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma tubular
Carcinoma cribiforme
Carcinoma mucinoso
Carcinoma medular
Carcinoma com diferenciação apócrina
Carcinoma com células em anel de sinete
Carcinoma micropapilífero invasivo
Carcinoma metaplásico
Carcinoma adenomioepitelioma
Carcinoma adenóide cístico
Carcinoma neuroendócrino
Carcinoma secretor
Carcinoma papilífero invasivo
Carcinoma de células acinares
Carcinoma mucoepidermóide
Carcinoma polimorfo
Carcinoma oncocítico
Carcinoma rico em lipídios
Carcinoma de células claras ricas em glicogênio
Carcinoma sebáceo

NST, *no special type*. [Adaptado de Sinn and Kreipe (2013)]¹¹

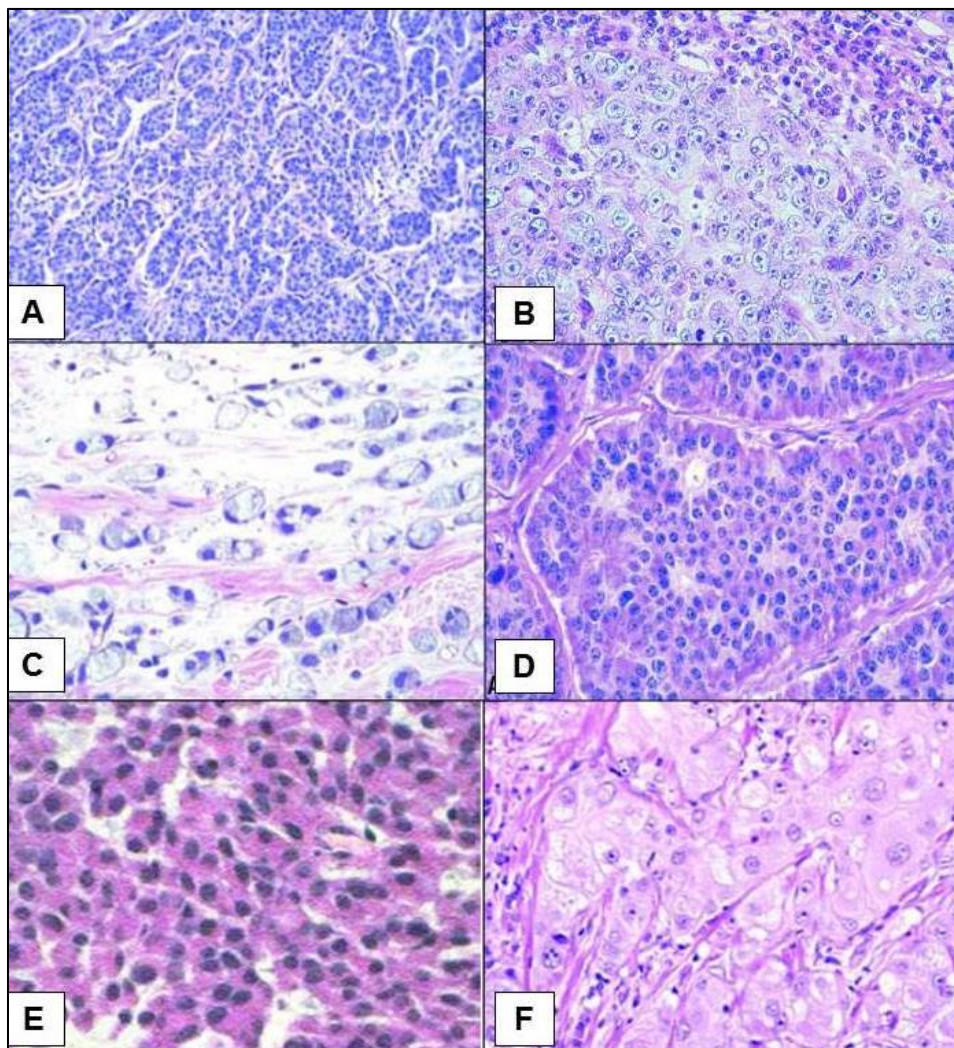


Figura 2. Tipos histológicos de CM (exemplos). **A:** carcinoma invasivo NST. **B:** carcinoma medular. **C:** carcinoma com células em anel de sinete. **D:** carcinoma neuroendócrino. **E:** carcinoma mucoepidermóide. **F:** carcinoma com diferenciação apócrina. [Adaptado de Ellis IO et al. (2003)]⁹

1.2.2. Grau histológico e estadiamento

O grau histológico (GH) é baseado na diferenciação celular e no número de mitoses no tecido tumoral, podendo ser classificado como bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) e pouco diferenciado (G3). Sendo que, quanto menor o grau de diferenciação, maior a rapidez de crescimento e gravidade do tumor.¹⁸

Para serem agrupadas nas categorias, as peças patológicas são analisadas em três aspectos: formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e índice de atividade mitótica. Este último é considerado o fator prognóstico de maior importância entre os três e é medido pela contagem celular da expressão de Ki-67¹⁶ (proteína nuclear expressa somente durante as fases de divisão celular)¹⁹. Realizada a análise, cada um dos escores são pontuados um a três e, ao final, as três pontuações são somadas. Resultados três, quatro, ou cinco correspondem a G1; seis ou sete a G2; e oito ou nove a G3.¹⁶

No entanto, quando o mesmo exame para o mesmo paciente é realizado em instituições diferentes, a concordância na classificação de grau histológico não ultrapassa 80%. Além desse aspecto, é considerável a proporção de tumores classificada como G2, o que não é informativo na decisão clínica, visto que nestes casos o risco de recorrência é intermediário. Por estes motivos, faz-se necessário a classificação complementar em estadios clínicos.¹⁸

O estadiamento permite classificar a evolução das neoplasias malignas e determinar a sobrevida dos pacientes, sendo realizado pelo Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, onde “T” avalia a dimensão do tumor primário, “N” a dimensão de disseminação para linfonodos regionais e “M” a presença ou não de metástases à distância. Pode ser realizado por exames clínicos, sendo classificado em T0 a T4; N0 a N3; e M0 ou M1. A combinação destas classificações determina os estadios clínicos: 0 para carcinomas “in situ”, I para invasão local inicial, II para tumor primário limitado ou invasão linfática mínima, III para tumor local extenso ou invasão local regional extensa e IV para tumor localmente avançado ou presença de metástases (**Tabelas 2, 3**). O mesmo critério de classificação é estabelecido para o estadiamento patológico (pTNM), realizado após o tratamento cirúrgico, considerando os exames na peça operatória. O pTNM determina a extensão da doença com maior precisão e pode, ou não, coincidir com o TNM.¹⁷

Tabela 2. Classificação TNM para tumores mamários.

Tamanho do tumor (T)
Sem evidência de tumor primário (T0)
≤ 2 cm (T1)
2 - 5 cm (T2)
> 5 cm (T3)
Extensão à parede torácica ou pele (T4)
Disseminação para linfonodos regionais (N)
Ausência de metástase (N0)
Axilar homolateral móvel (N1)
Axilar homolateral fixo ou mamário interno homolateral (N2)
Infraclavicular, mamário interno e axilares, ou supraclavicular (N3)
Metástase à distância (M)
Ausência de metástase à distância (M0)
Presença de metástase à distância (M1)

[Adaptado de TNM: Classificação de Tumores Malignos (2004)]¹⁷

Tabela 3. Classificação por estadios clínicos para tumores mamários.

Grupamento por Estadios			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
Estadio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estadio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

T, tamanho; N, disseminação para linfonodos regionais; M, metástases à distância; Tis, tumor *in situ*. [Adaptado de TNM: Classificação de Tumores Malignos (2004)]¹⁷

1.2.3. Subtipos moleculares

Pela técnica de imunohistoquímica (IHQ) é possível diferenciar o CM em subtipos moleculares, considerando a expressão de receptor de estrógeno (RE), de progesterona (RP) e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, i.e. *human epidermal growth factor receptor 2*), além de avaliar o perfil proliferativo pelo Ki-67.^{10,13,20} A **Tabela 4** apresenta resumidamente o perfil de cada subtipo.

Tabela 4. Classificação segundo a expressão de receptores hormonais e de proliferação celular.

Subtipos Moleculares		RE	RP	HER2	Ki67
Luminais	A	+	+	-	<14%
	B	+	+	+/-	≥14%
Triplo-negativos	Basal-like	-	-	-	
	<i>Claudin-low</i>	-	-	-	
Superexpressão de HER2		-	-	+	

RE, receptor de estrógeno; RP, receptor de progesterona; HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*. [Adaptado de Eroles et al. (2013);¹³ Strehl et al. (2011)]¹⁴

O subtipo luminal, com expressão de genes comuns às células luminais normais dos ductos mamários, compreende a maior parte dos CM e apresenta positividade para RE e RP na IHQ, sendo fator preditivo para a eficácia da terapia hormonal, e é diferenciado em luminal A e B de acordo com a contagem de Ki-67. Tumores luminais A representam 50% a 60% de todos os CM, têm expressão baixa de genes de proliferação com Ki-67 < 14% e possuem prognóstico favorável, sendo de baixo grau histológico. A taxa de recidiva é a menor comparada aos outros subtipos (27,8%), com padrões distintos de recorrência, sendo 18,7% metástases ósseas. Todos os carcinomas lobulares invasivos são luminais A^{13,14,21} e possuem maior prevalência em mulheres brancas pós-menopausa.²²

Os tumores luminais B apresentam maior índice proliferativo com Ki-67 ≥ 14% e podem apresentar ou não a expressão de HER2. O prognóstico é o pior comparado ao

luminal A, com maior grau histológico e taxa de recidiva de 30%, sendo o fígado o órgão acometido em 13,8% dos casos. O tumor luminal B foi relacionado a pacientes com maior idade na primeira gestação, maior consumo de álcool e uso de terapia de reposição hormonal (TRH) pós-menopausa.^{13,14,21}

Ao contrário dos luminais, os subtipos *basal-like*, triplo-negativo não *basal-like* e superexpressão de HER2 não apresentam positividade para RE e RP na IHQ. O último subtipo representa 15 a 20% dos casos e apresenta aumento na expressão de HER2 e outros genes relacionados à mesma via metabólica. Apresentam proliferação celular elevada, sendo 75% com maior grau histológico, podendo ser considerados o segundo com pior prognóstico. Mutações no gene que codifica a proteína p53 estão presentes em 40% dos casos.^{13,14}

O subtipo *basal-like* é o de pior prognóstico, está presente em 10 a 20% dos CM, expressa genes de células mioepiteliais mamárias incluindo genes de citoqueratinas que possuem peso molecular elevado. Apresenta RE, RP e HER2 negativos à análise por IHQ. Os padrões de metástases são graves com predominância em órgãos viscerais.^{13,14,23} Este subtipo está relacionado ao diagnóstico de CM em mulheres jovens, predominantemente de origem africana, com tumor de tamanho grande ao diagnóstico.^{22,23} Tende a ser carcinoma invasivo NST com índice mitótico elevado, necrose tumoral e resposta linfocítica estromal clara. Possui maior prevalência em portadores de mutações nos genes *BRCA1* (i.e. *Breast Cancer Gene 1*) e *p53* (gene da proteína p53).¹³

Na categoria de tumor triplo-negativo não *basal-like*, encontra-se o subtipo *Claudin-low* identificado recentemente. Neste subtipo, ocorre a perda da expressão de genes envolvidos nas junções de adesão intercelular. O prognóstico é semelhante ao *basal-like*, com maior infiltração de células imunes e redução na expressão de genes de proliferação.^{13,14}

1.2.4. Fatores de risco

Algumas condições, em conjunto ou isoladamente, podem predispor o desenvolvimento de câncer em determinados tecidos. Comportamentos que incluam tabagismo, alcoolismo, dieta rica em alimentos de elevada densidade calórica e baixo valor nutricional, somados à inatividade física representam os principais fatores de risco relacionados ao estilo de vida.²⁴

Dentre os fatores ambientais encontram-se as exposições ocupacionais, ou não, aos pesticidas, solventes, metais pesados (crômio, cádmio, níquel), radiações (inclusive solares) e poluição do ar e da água. Podemos citar ainda, agentes infecciosos que representam causa importante de neoplasias em países menos desenvolvidos, sendo que 30% destes ocorrem em indivíduos com idade inferior a 50 anos.²⁴

Particularmente, o CM em mulheres apresenta fatores de risco específicos relacionados ao estilo de vida reprodutivo. Os hormônios sexuais estrógeno e progesterona estimulam a proliferação celular e diminuem a apoptose no tecido mamário. Dessa forma, fatores que aumentem a exposição a estes hormônios durante a vida, podem aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias da mama. Dentre eles, podem ser citados: menarca precoce; nuliparidade ou poucos filhos com idade mais avançada na chegada do primeiro; infertilidade; ausência ou curtos períodos de amamentação; menopausa tardia; TRH de longa duração no período pós-menopausa; e uso contínuo de contraceptivos orais antes dos 20 anos.^{8,9}

Outras situações como resistência à insulina e obesidade podem ocasionar maior produção de hormônios sexuais pelos ovários e adrenais, principalmente andrógenos. Em mulheres pós-menopausa o aumento de androstenediona leva à formação de estrógenos pelo tecido adiposo. Em relação à dieta, o excesso na ingestão de colesterol (precursor na síntese de hormônios esteróides) e a exposição à xenohormônios (produtos artificiais que mimetizam a atividade hormonal) também predis põem ao maior risco para o CM.^{8,9}

Mutações em genes que participam do controle do ciclo celular e integridade do DNA constituem fatores genéticos hereditários e representam 5 a 10% de todos os casos de CM. Mutações de linhagem germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (i.e. *Breast Cancer Gene 2*) possuem penetrância de até 87% e 68%, respectivamente, para o CM quando há

história familiar para a doença.²⁵ No entanto, pesquisas recentes indicam a existência de outros genes que atuam modificando esta penetrância nos portadores; modulando a gravidade da doença, e/ou alterando o risco de desenvolvimento.^{26,27} Além disso, modificações epigenéticas, como acetilação de histonas e metilação das ilhas CpG, podem ocorrer devido à influência dos fatores ambientais e estilo de vida na interação genoma-microbioma, causando o silenciamento de genes importantes e predispondo à formação de tumores.²⁸⁻³⁰

1.3. Genes dos receptores de estrógeno

O estrógeno é um hormônio esteroide que regula o crescimento, desenvolvimento e fisiologia do sistema reprodutivo humano, além de influenciar os sistemas neuroendócrino, esquelético e cardiovascular. Suas funções dependem da ligação aos receptores RE α (receptor de estrógeno alpha) e RE β (receptor de estrógeno beta) nas células-alvo.³¹

Os receptores de estrógeno (REs) são codificados por genes distintos, sendo o RE α pelo gene *Estrogen Receptor 1 - ESR1*, presente no locus 6q24.q27 e possui oito éxons.³² Enquanto o RE β é codificado pelo gene *Estrogen Receptor 2 - ESR2*, presente no locus 14q22.q24, que também apresenta oito éxons e codifica cinco variantes³³ (**Figura 3**).

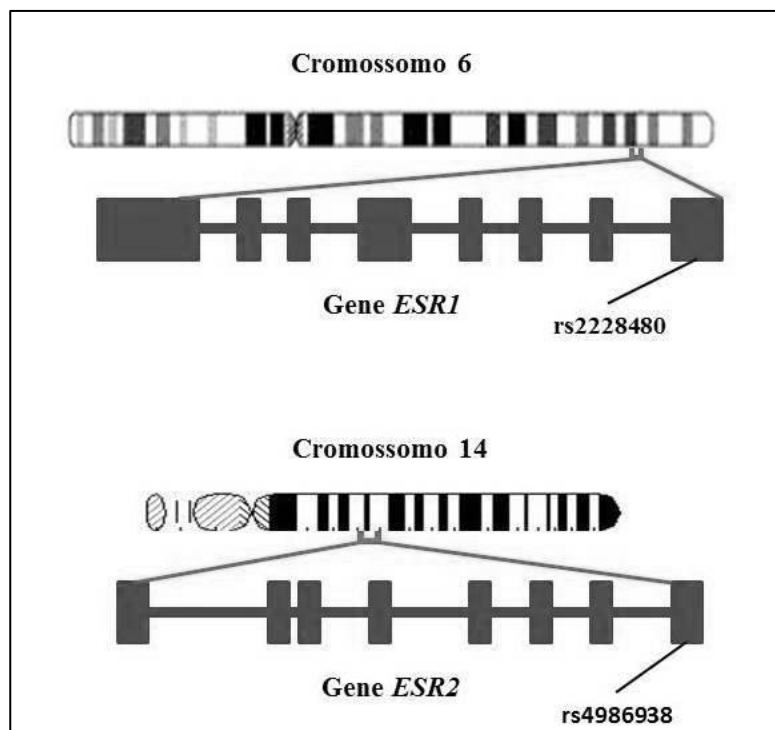


Figura 3. Representação dos genes *ESR1* e *ESR2* e respectivos polimorfismos. *ESR1*, *Estrogen Receptor 1*; *ESR2*, *Estrogen Receptor 2*.

RE α e RE β apresentam grande similaridade, sendo que a maior diferença é encontrada no domínio AF-1 (i.e. *activation function 1*) como demonstrado na **Figura 4**.^{31,34} O domínio A/B N-terminal consiste na AF-1 a qual contribui para a atividade transcricional e é um domínio essencial para a interação com co-reguladores. O domínio C (DBD, i.e. *DNA binding domain*) é a região que se liga a sequências específicas do DNA, regulando a expressão de genes alvos. O domínio D inclui sequências de aminoácidos que estimulam a sinalização da localização nuclear e facilita modificações pós-transcricionais. Finalmente, o domínio E/F (LBD, i.e. *ligand-binding domain*) na região C-terminal serve como sítio de interação com co-reguladores sendo um domínio AF-2 (i.e. *activation function 2*).^{31,35}

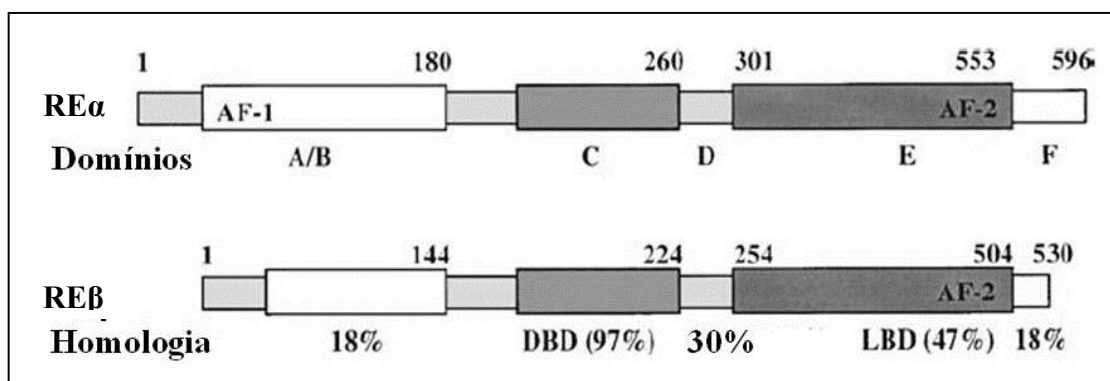


Figura 4. Representação estrutural das isoformas humanas dos receptores REα e REβ. REα, receptor de estrógeno alpha; AF-1, *activation function 1*; AF-2, *activation function 2*; REβ, receptor de estrógeno beta; DBD, *DNA binding domain*; LBD, *ligand-binding domain*. [Adaptado de Kong et al. (2003)]³⁴

O mecanismo de ação dos REs pode ser genômico ou não genômico. A ação genômica, também definida como clássica, consiste na ligação do estrógeno aos REs no citoplasma, com posterior dimerização destes, formando um complexo ativo que é direcionado para o núcleo. Assim, modulam a expressão de genes alvos ao se ligar a regiões específicas do DNA (elementos de resposta ao estrógeno – EREs) localizadas próximas aos promotores, ou pela interação com fatores de transcrição. Em síntese, atuam promovendo o recrutamento de co-reguladores que influenciam modificações pós-transcricionais de histonas e outros fatores de transcrição, e regulam a atividade do maquinário transcricional da RNA polimerase II.³⁶ Por outro lado, as ações não genômicas são mediadas por REs ancorados à membrana citoplasmática que, ao se ligarem ao estrógeno, iniciam a ativação de uma variedade de sinais citoplasmáticos de vias de transdução. Estes sinais podem ocasionar tanto funções diferenciais para proteínas citoplasmáticas quanto a regulação da expressão gênica.³⁶ Estes mecanismos convergem para promover o crescimento e proliferação, suprimindo a apoptose.³⁷ Na ausência do hormônio, o receptor é mantido no citoplasma como um complexo com proteínas inibitórias.³⁵

As populações relativas das duas isoformas variam entre diferentes tecidos, sendo as ações tecido-específicas. O REα é muito expresso no útero, estroma da próstata, células da teca no ovário, células de Leydig nos testículos, epidídimo, mama e fígado. Já o

RE β , é expresso no epitélio prostático, testículo, células da granulosa no ovário, medula óssea, cérebro e pulmão.^{31,35}

O RE α é responsável pelo desenvolvimento da glândula mamária, regulando a morfogênese ductal na puberdade e a alveologênese durante a gravidez e lactação. No entanto, regula negativamente a expressão de proteínas que atuam na resposta a danos ao DNA (por exemplo, a BRCA1), suprimindo o processo de reparo de alta fidelidade, levando ao acúmulo de danos à molécula. Ao mesmo tempo, impede a apoptose ao interferir na transcrição de genes alvos da proteína p53.³⁷ Dessa forma, participa da proliferação desregulada nas células tumorais da mama, enquanto o RE β se opõe às suas ações, modulando a expressão de genes por ele regulados e reduzindo a migração de células tumorais.³⁶

Polimorfismos em genes dos REs foram associados à osteoporose, osteoartrite, doença coronariana, doenças cerebrais como a de Alzheimer, câncer endometrial, tireoidiano, colorretal, prostático e mamário.^{38,39} Dentre esses, os polimorfismos de fragmento de restrição PvuII (rs22344693) e XbaI (rs934099), localizados em sítios de *splicing*, e a variante sinônima c.2014G>A (rs2228480) são os mais estudados no gene *ESR1*. Enquanto para o gene *ESR2* são os polimorfismos de repetição TA (rs3138774) na região promotora e o c.1730G>A (4986938) na região regulatória.³⁹

O polimorfismo c.2014G>A (rs2228480) no gene *ESR1*, está localizado no éxon 8, correspondente ao códon 594 (domínio F da proteína) e não leva à troca do aminoácido, permanecendo a treonina⁴⁰ (**Figuras 3 e 4**). No entanto, pesquisas revelam que alterações sinônimas na sequência do DNA podem ocasionar a diminuição na expressão da proteína, caso ocorra em sítios: (i) de *splicing*, (ii) de reconhecimento de fatores de transcrição, (iii) de modificações pós-transcricionais, (iv) de pausa ribossômica para dobramento da proteína, dentre outros.^{41,42} Mesmo sendo desconhecido o efeito desse SNP (i.e. *single nucleotide polymorphism*) na expressão do RE α , diferentes estudos encontraram associação com o CM em diferentes populações na Tunísia, Irã e China, nas quais a frequência da variante foi entre 0,13 e 0,19.^{38,43,44} Não há estudos desse polimorfismo na população brasileira.

Já o SNP c.1730G>A (rs4986938) está localizado no éxon 8 do gene *ESR2* que corresponde à região 3'-UTR (i.e. *untranslated region*)⁴⁵ (**Figura 3**). Putnik et al. (2009)⁴⁶ verificaram que o alelo A é responsável pela menor expressão do RE β e o mecanismo não está relacionado aos fatores que causam a instabilidade do RNAm. Nota-se que a associação desse SNP com o CM apresenta resultados discordantes entre diferentes estudos.^{47,48} Apenas quando é combinado a outras condições como ingestão de isoflavona, *status* de menopausa e uso de TRH, pode alterar o risco para o desenvolvimento de CM.^{49,50} Na população brasileira, a frequência da variante é 0,33, de acordo com estudo realizado no estado de São Paulo.⁵⁰

1.4. Gene *MTHFR*

O gene *MTHFR* (*Methylenetetrahydrofolate Reductase*) está localizado na região 1p16.22, possui 11 éxons⁵¹ e codifica a enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). A expressão é tecido-específica e apresenta variações quantitativa e qualitativa entre diferentes tecidos⁵² (**Figura 5**).

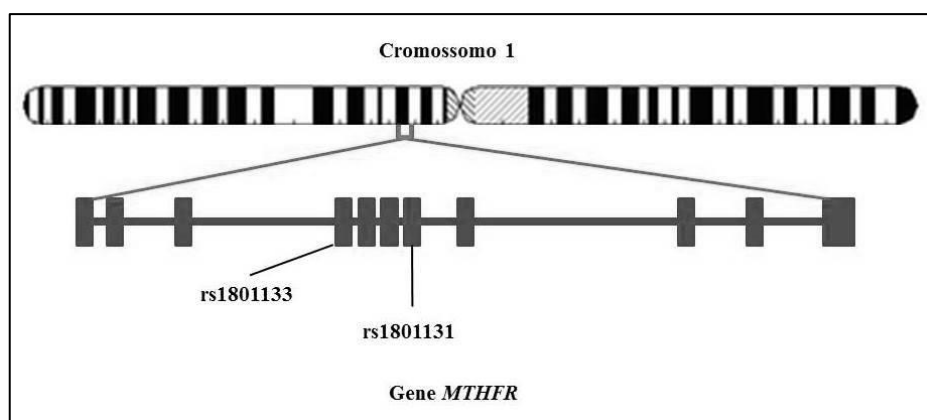


Figura 5. Representação do gene *MTHFR* e polimorfismos. *MTHFR*, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*.

A proteína MTHFR é composta por 656 aminoácidos,⁵¹ é uma flavoenzima citoplasmática que regula o balanço celular entre a metilação e a síntese de ácidos nucleicos, por canalizar a distribuição de folato. Dessa forma, catalisa a conversão de 5,10-metilenotetrahydrofolato em 5-metiltetrahydrofolato, a forma de folato mais abundante na circulação e fonte de grupos metil para a metilação da homocisteína em metionina. Esta última é convertida em S-adenosilmetionina (SAM) que é um doador metil universal para muitas reações biológicas, tais como a metilação de proteínas e ácidos nucleicos (**Figura 6**).⁵³ Além disso, a enzima promove a manutenção da heterocromatina em condições normais.⁵⁴

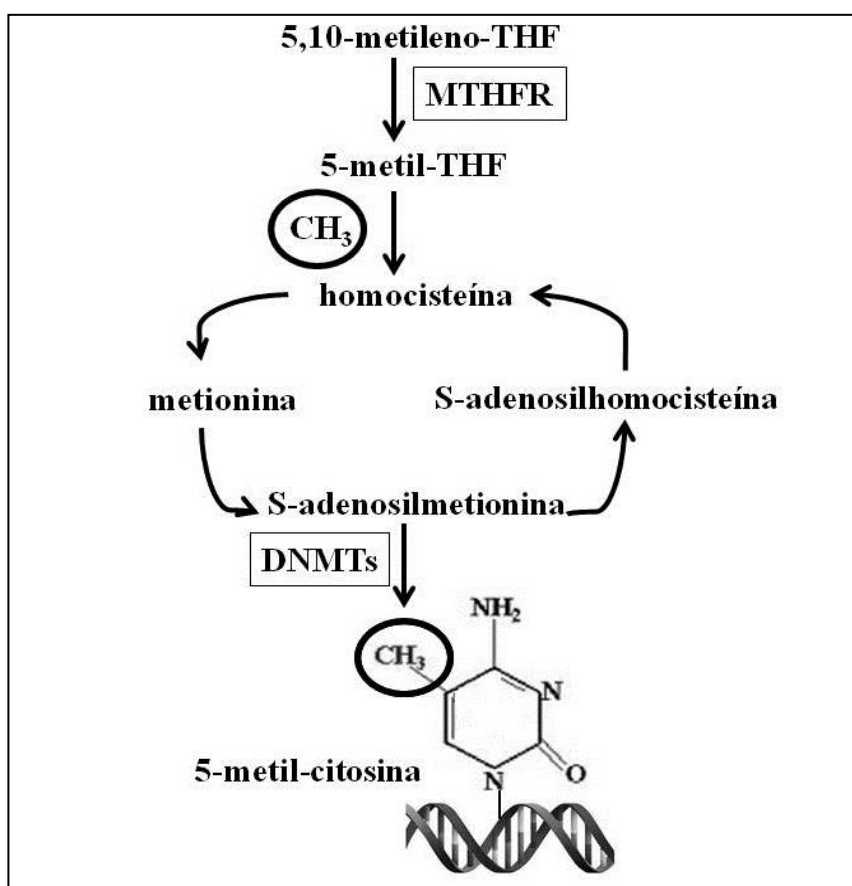


Figura 6. Esquema simplificado do processo de metilação do DNA. THF, tetrahydrofolato; MTHFR, enzima metilenotetrahydrofolato redutase; DNMTs, DNA metiltransferases.

Existem duas variantes comuns no gene *MTHFR*, os polimorfismos c.677C>T (rs1801133) e c.1298A>C (rs1801131) (**Figura 5**), que são frequentes na população e estão associados à redução para até 30% da atividade enzimática da proteína para os alelos 1298C e 677T.⁵⁵ Como consequência, ocorre o acúmulo de substratos da via que perturbam a homeostase e predispõem às doenças, além de afetar a síntese de ácidos nucleicos e disponibilidade de grupos metil para diversos processos bioquímicos celulares.^{55,56}

O polimorfismo c.677C>T corresponde a troca de uma citosina por uma timina no éxon 4 e consequente substituição de uma alanina por uma valina no códon 222, no domínio catalítico N-terminal e sítio de ligação do cofator FAD (*flavine-adenine dinucleotide*) da proteína.⁵⁷ Enquanto o polimorfismo c.1298A>C ocorre no éxon 7, com a troca de uma adenina por uma citosina, ocasionando a substituição de um ácido glutâmico por uma valina no domínio regulatório C-terminal da proteína, códon 429.⁵⁸

Pesquisas revelaram a associação destes polimorfismos ao câncer em diferentes órgãos como fígado, pâncreas, esôfago, estômago, cólon, pulmão e mama⁵⁹⁻⁶² e à sobrevivência após a cirurgia.⁶³ O risco para desenvolvimento de câncer em portadores de alelos que diminuam a atividade da enzima sofre interferências de fatores ambientais, como por exemplo, a ingestão de ácido fólico proveniente da dieta.⁶⁴

A frequência das variantes da população brasileira é de 0,31 para o c.677C>T e 0,22 para o c.1298A>C de acordo com pesquisa realizada no estado de São Paulo.⁶⁴

Castro et. al. (2004)⁶⁵ detectaram hipometilação do DNA em leucócitos de sangue periférico e aumento nos níveis de homocisteína em indivíduos com diminuição da atividade enzimática da *MTHFR* em decorrência desses SNPs. Estes podem ser relacionados, inclusive, à doença cardiovascular, falência renal, anormalidades congênitas, abortos e outras doenças.^{55,66}

1.4.1. Metilação

A metilação de ácidos nucleicos ocorre em citosinas que precedem guaninas (dinucleotídeos CpG) a partir de reações utilizando SAM, catalisadas por DNA metiltransferases (DNMTs) que adicionam um grupo metil ao anel da citosina formando metil-citosina (**Figura 6**).^{29,67}

Regiões não codificantes do DNA que permanecem metiladas replicam mais rápido que as não metiladas, o que significa que esta condição assegura a replicação tardia da maior parte do genoma. Tal replicação está associada com a formação de cromatina inativa que facilita o silenciamento transcricional de regiões não codificantes.⁶⁷ Dessa forma, este evento é comum em ilhas CpGs (locais com maior concentração de CpG), frequentemente localizadas em regiões regulatórias 5'-UTR, íntrons, elementos repetitivos e transponíveis, sequências virais inseridas no genoma, *imprintings* genômicos e inativação do cromossomo X.^{29,67,68}

Em tecidos neoplásicos, a hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores tumorais é frequente, sendo responsável por perda do controle do ciclo celular, alteração na regulação pelos fatores de transcrição, ruptura da interação célula-célula e célula-substrato e múltiplos tipos de instabilidade genética.²⁸⁻³⁰

A hipometilação também pode ocorrer em tumores. Neste caso, envolve proto-oncogenes ou outros elementos, ocasionando: instabilidade cromossômica; reativação de elementos transponíveis; perda de *imprinting*; recombinação mitótica, levando a deleções e translocações; e rearranjos cromossômicos.²⁹

Fatores genéticos desempenham função chave na manutenção de um padrão normal de metilação, por exemplo, polimorfismos em genes envolvidos diretamente neste processo (*Methylenetetrahydrofolate Redutase* - *MTHFR*, *Methionine Synthetase* - *MTR*, *Tymidylate Synthetase* - *TYMS*), somados ou não à ingestão de nutrientes como folato, metionina, colina, vitamina B12 e betaína.^{30,53,64,70} Além disso, influência ambiental ocorrendo precocemente no desenvolvimento, pode predispor ao câncer e a outras doenças por modificações no epigenoma.³⁰

2. JUSTIFICATIVA

Como descrito, o CM representa grave problema de saúde pública. Trata-se de uma doença heterogênea de etiologia multifatorial, na qual a escolha terapêutica e a predição da evolução clínica se tornam um desafio para oncologistas. A esperança está na medicina personalizada onde o manejo da doença se faz de forma individual considerando os aspectos genéticos e o estilo de vida de cada paciente, além das características biológicas do tumor.

O estrógeno desempenha importante papel na etiologia da doença por estimular a proliferação celular na glândula mamária. Dessa forma, o estudo de polimorfismos nos genes dos receptores de estrógeno e das características do estilo de vida reprodutivo é importante para estimar os riscos para a doença, bem como para elucidar o comportamento biológico do CM.

A maioria dos casos de CM ocorre esporadicamente sem que haja mutações em genes supressores tumorais, o que sugere a ocorrência de mecanismos epigenéticos. Visto que a enzima MTHFR é imprescindível para a disponibilidade de grupos metil no processo de metilação do DNA, o estudo de polimorfismos que alterem a atividade enzimática é importante para indicar o possível desequilíbrio na manutenção do epigenoma e, assim, a predisposição para a doença.

Se forem confirmadas as hipóteses, tais parâmetros poderão ser utilizados para: prever a predisposição dos indivíduos ao desenvolvimento de CM; caracterizar a evolução e a gravidade naqueles pacientes diagnosticados; e direcionar as estratégias terapêuticas para o melhor acompanhamento dos pacientes, fornecendo subsídios para melhorar a qualidade de vida.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Avaliar a associação entre CM esporádico e polimorfismos em genes que codificam os receptores de estrógeno (*ESR1* e *ESR2*), bem como, no gene *MTHFR* associado ao metabolismo do folato.

3.2. Específicos

1. Verificar a frequência dos polimorfismos: c.2014G>A (rs2228480) no gene *ESR1*, c.1730G>A (rs4986938) no gene *ESR2*, c.677C>T (rs1801133) e c.1298A>C (rs1801131) no gene *MTHFR* em pacientes diagnosticados com CM esporádico e no grupo controle.

2. Associar os polimorfismos nos genes especificados com a ocorrência de CM esporádico comparando com o grupo controle para a análise de fator de risco.

3. Analisar as características clínicas e histológicas no grupo de pacientes com CM, verificando a possibilidade de se utilizar os polimorfismos como marcadores biológicos de gravidade no CM esporádico.

4. Associar as características do estilo de vida reprodutivo das pacientes com CM aos polimorfismos, verificando se juntos alteram o risco para o desenvolvimento e gravidade do CM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (Unicamp) (parecer nº185.106) (**Anexo 1**).

4.1. Casuística

Foram selecionadas 253 amostras de DNA extraídas de leucócitos de sangue periférico, de pacientes do sexo feminino com idade superior a 50 anos e diagnóstico de CM esporádico, atendidos no Ambulatório de Oncologia do Hospital de Clínicas (HC-Unicamp). Os critérios de inclusão foram: idade superior a 50 anos e ausência de recorrência familiar precoce para CM ou outros tipos de câncer. As respectivas amostras encontravam-se armazenadas, sob o consentimento dos pacientes, no banco de DNA do Laboratório de Genética Molecular do Câncer, sob a responsabilidade da Professora Dr^a Carmen Sílvia Passos Lima.

Para compor o grupo controle, foram convidadas a participarem do estudo mulheres com idade superior a 50 anos, sem história de câncer ou casos de CM e câncer de ovário na família, de origem geográfica semelhante às pacientes. Participaram desse grupo 257 voluntárias, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 2**) e coleta de um tubo de sangue (aproximadamente 7,5 mL) contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).

4.2. Técnica

4.2.1. *Extração de DNA do sangue periférico*

Para a extração do DNA das amostras de sangue periférico referentes ao grupo controle, foi realizada a técnica por cloreto de lítio [modificada de Whoodhead et al. (1986)].⁷¹ Logo após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1300 g por 10 minutos para a separação e descarte do plasma. Em seguida, os tubos foram congelados a temperatura de -20°C por, pelo menos, quatro horas. Após o descongelamento, houve a

homogeneização e transferência de 500 µL do sedimento para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. A este tubo foram adicionados 800 µL de tampão de lise celular (Sacarose 320 mM; Tris-HCl pH 7,5 10 mM; MgCl₂ 5 mM; Triton 100X 1%), com posterior homogeneização por 15 segundos, centrifugação por cinco minutos a 7800 g e descarte do sobrenadante. Essa etapa foi repetida por duas vezes ou até que o precipitado adquirisse cor clara. Na sequência, foram acrescentados 395 µL de tampão de digestão (Tris-HCl pH 7,5 10 mM; EDTA 1 mM; NaCL 10 mM; SDS 0,5%) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). O precipitado foi ressuspenso e homogeneizado durante 15 segundos. Logo após, as amostras permaneceram em banho-maria a 55°C por duas horas, sendo agitadas brevemente após uma hora.

Transcorridas duas horas de incubação a 55°C, foram acrescentados 200 µL de cloreto de lítio 7,5 N e as amostras foram resfriadas a -20°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 20700 g durante 10 minutos para a precipitação de contaminantes. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo onde foram acrescentados 1000 µL de etanol 100% concentrado gelado. O tubo foi invertido, aproximadamente, 50 vezes ou até que o DNA precipitasse visivelmente. Logo após, houve a centrifugação a 20700 g durante 10 minutos com posterior descarte do álcool seguido da adição de 1000 µL de álcool 70% concentrado. Após leve agitação, estes foram centrifugados novamente e o álcool descartado. Feito isso, o tubo permaneceu à temperatura ambiente para a evaporação natural do álcool. Por último, o DNA extraído foi ressuspenso acrescentando-se 60 µL de água deionizada estéril, homogeneizado e levado ao banho-maria a 55°C por 10 minutos. Finalmente, as amostras de DNA foram quantificadas no equipamento EPOCHTM (Bio Tek Instruments Inc, USA) e armazenadas a -20°C.

4.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a genotipagem dos polimorfismos c.2014G>A no gene *ESR1*, c.1730G>A no gene *ESR2*, c.677T>C e c.1298A>C no gene *MTHFR*, as amostras de DNA dos sujeitos e controles foram submetidas à técnica de RFLP-PCR (*restriction fragment length polymorphism – polymerase chain reaction*).

Primeiramente, foi realizada a PCR para a amplificação da região no gene onde se localiza o polimorfismo. As reações para cada SNP foram padronizadas dentro das mesmas condições de ciclagem e concentração dos reagentes (**Tabela 5**), diferindo apenas na temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), cujas sequências foram obtidas da literatura (**Tabela 6**).

Tabela 5. Concentração dos reagentes utilizados na PCR para os polimorfismos nos genes *ESR1*, *ESR2* e *MTHFR*.

Reagentes* em 30 µL de volume final	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>MTHFR</i>	
	c.2014G>A	c.2014G>A	c.677C>T	c.1298A>C
Tris-HCl pH 8,8 (mM)	75	75	10	10
KCl (mM)	-	-	50	50
Tampão Nonidet P40 (%)	-	-	0,08	0,08
(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)	20	20	-	-
Tween 20 (%)	0,01	0,01	-	-
MgCl ₂ (mM)	2	2	2	2
dNTP (mM-cada)	0,10	0,10	0,10	0,10
<i>Primers</i> ** (mM-cada)	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>Taq polimerase</i> (U)	1,5	1,5	1,5	1,5
DNA (ng)	50	50	50	50

*Thermo Fisher Scientific, Inc, USA

**Sigma-Aldrich Co, USA

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; *ESR2*, *Estrogen Receptor 2*; *MTHFR*, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*; dNTP, desoxirribonucleotídeos.

Tabela 6. Sequência dos *primers* utilizados nas PCRs.

SNP	<i>Primers</i> (5'-3')	T °C	Fragmento (pb)
c. 2014G>A	F: 5'-GAGGAGACGGACCAAAGCCAC-3'	58,5	227
	R: 5'-GCCATTGGTGTGATGCATGC-3'		
c. 1730G>A	F: 5'-TTTTGTCCCCATAGTAACA-3'	54	307
	R: 5'-AATGAGGGACCACACAGCA-3'		
c. 677T>C	F: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	58	198
	R: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'		
c. 1298 A>C	F: 5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA-3'	53	163
	R: 5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3'		

PCRs, *polymerase chain reactions*; F, *forward*; R, *reverse*, T: temperatura, pb: pares de base.

Após o preparo, as reações foram submetidas à temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura de anelamento por 30 seg e 72°C por 1 minuto, finalizando com 72°C por 10 minutos. As PCRs foram realizadas no termociclador Eppendorf Modelo 22331 (Eppendorf - Hamburg, Germany) e as temperaturas de anelamento utilizadas foram 58,5; 54; 58 e 53°C, respectivamente, para os SNPs c.2014G>A, c.1730G>A, c.677T>C e c.1298A>C (**Tabela 6**).

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com o objetivo de verificar o sucesso e a qualidade do DNA amplificado para posterior digestão com enzimas de restrição. Cada polimorfismo apresentou um fragmento de tamanho específico no gel: 227 pb (pares de base) para c.2014G>A, 307 pb para c.1730G>A, 198 pb para c.677T>C e 163 pb para c.1298A>C (**Tabela 6**).

4.2.3. Digestão com enzima de restrição e genotipagem dos SNPs

Para as reações de digestão foi utilizado o produto das PCRs, enzimas de restrição específicas e incubação a 37°C por 16 horas. Os reagentes e suas concentrações estão representados na **Tabela 7**. Para os polimorfismos c.677C>T e c.1730G>A, as variantes raras T e A criam um sítio de reconhecimento para as enzimas *HinfI* e *AluI*, respectivamente. Enquanto que as variantes raras C e A nos polimorfismos c.1298A>C e c.2014G>A abolem um sítio de restrição para as enzimas *MboII* e *BtgI*, respectivamente. Assim, após a incubação as amostras foram submetidas à eletroforese em géis de agarose ou acrilamida (**Figuras 7 a 10**), sendo possível diferenciar os genótipos de cada SNP (**Tabela 8**).

Tabela 7. Condições das reações de digestão para os polimorfismos nos genes *ESR1*, *ESR2* e *MTHFR*.

Reagentes	<i>MTHFR</i> c.677T>C e c.1298A>C	<i>ESR1</i> G2014A	<i>ESR2</i> A1730G
Produto da PCR (μL)	10	5	
Tampão* (μL)	2	1	
Enzima* (U)	2,5	1,25	
H ₂ O (μL)	2,5	1,25	
Volume final (μL)	15	7,5	
Temperatura (°C)	37	37	

*New England Biolabs, Inc, USA

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*; *ESR1*, *Estrogen Receptor 1*; *ESR2*, *Estrogen Receptor 2*; PCR, *polymerase chain reation*.

Tabela 8. Fragmentos gerados pela digestão enzimática e análise dos polimorfismos.

*fragmento utilizado na identificação do alelo

Gene	SNP	PCR (pb)	Alelo 1	Alelo 2	Heterozigoto
ESR1	c.2014G>A	227	129, 98	227	227, 129, 98
ESR2	c.1730G>A	307	307	242, 65	307, 242, 65
	c.677C>T	198	198	175, 23	198, 175, 23
MTHFR	c.1298A>C	163	56, 31, 30,	84, 31,	84, 56, 31, 30,
			28, 18	30,18	28, 18

SNP, *single nucleotide polymorphism*; PCR, *polymerase chain reation*; pb, pares de base; *ESR1*, *Estrogen Receptor 1*; *ESR2*, *Estrogen Receptor 2*; *MTHFR*, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*.

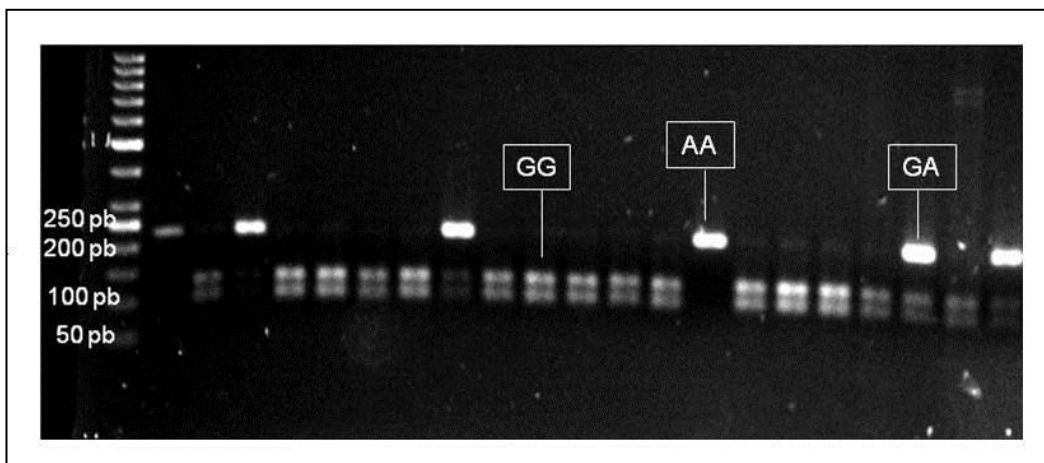


Figura 7. Análise do polimorfismo c.2014G>A no gene *ESR1* em gel de agarose 2%, onde ↓ indica o produto da PCR não digerido (227 pb); e os demais fragmentos representam os genótipos GG (129,98), AA (227) e GA (129, 98, 227).

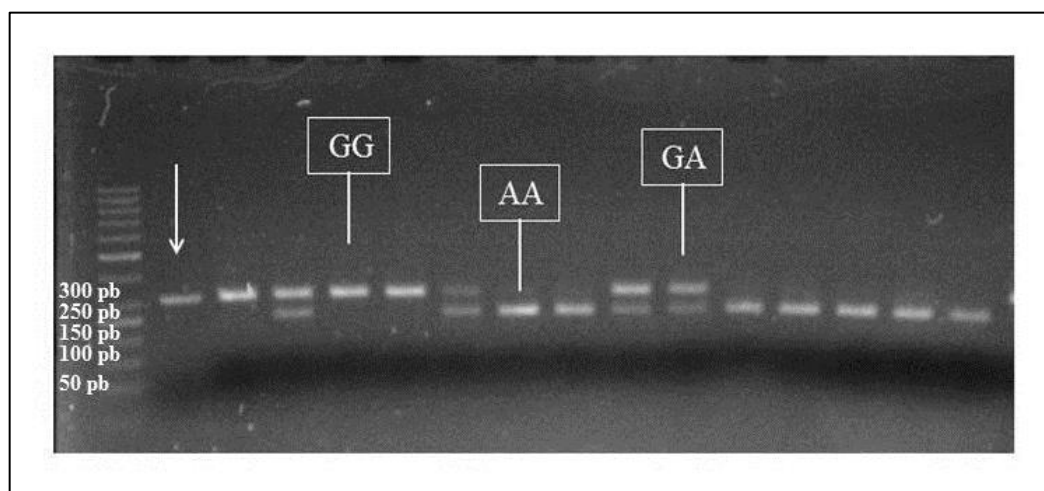


Figura 8. Análise do polimorfismo c.1730G>A no gene *ESR2* em gel de agarose 2%, onde ↓ indica o produto da PCR não digerido (307 pb); e os demais fragmentos representam os genótipos GG (307), GA (307, 242) e AA (242).

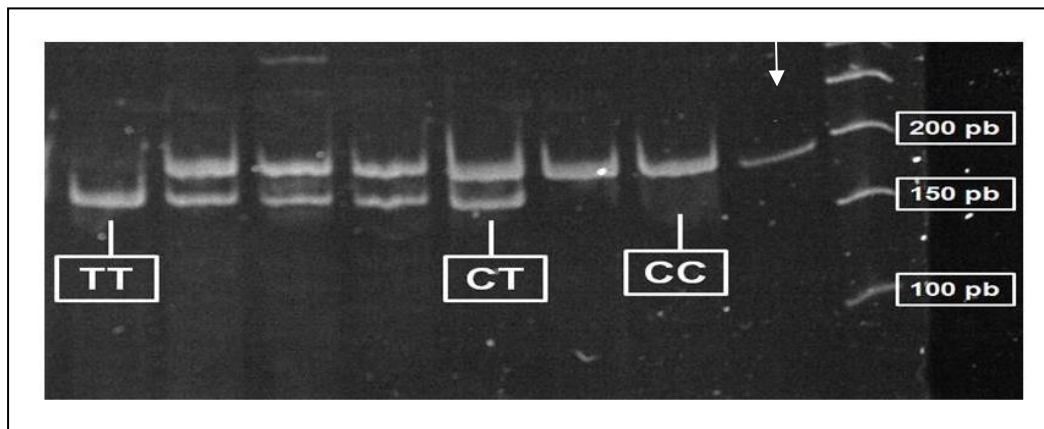


Figura 9. Análise do polimorfismo c.677C>T no gene *MTHFR* em gel de poliacrilamida a 12%, onde ↓ indica o produto da PCR não digerido (198 pb); e os demais fragmentos representam os genótipos CC (198), TT (175) e CT (198, 175).

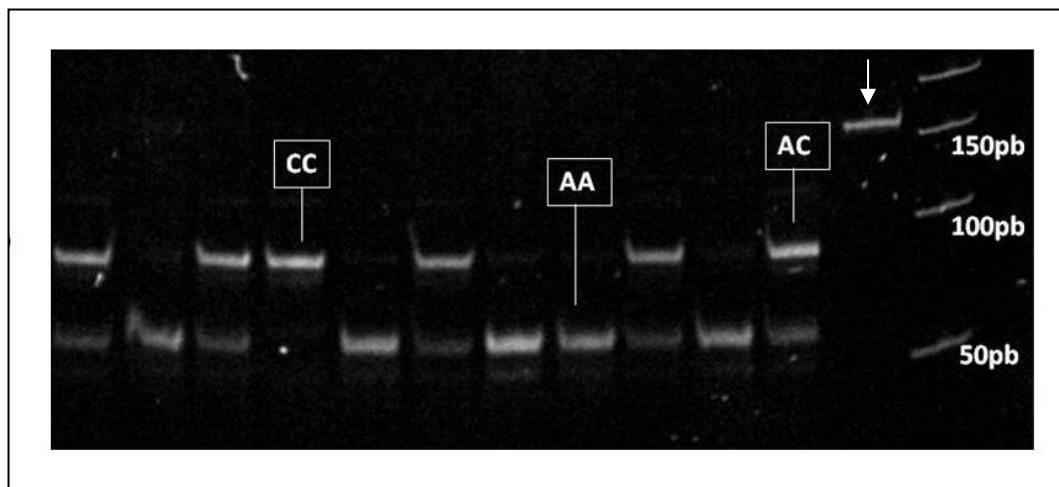


Figura 10. Análise do polimorfismo c.1298A>C no gene *MTHFR* em gel de poliacrilamida a 14%, onde ↓ indica o produto da PCR não digerido (163 pb); e os demais fragmentos representam os genótipos AA (56,31), CC (84,31) e AC (84,56,31).

4.3. Variáveis Clínicas

No presente estudo, os dados clínicos foram obtidos no banco de dados do Laboratório de Genética do Câncer, realizado em estudos anteriores, nos quais os dados ao diagnóstico foram coletados dos prontuários arquivados no HC-Unicamp. Assim, para descrição da amostra e comparação com os polimorfismos analisados, foram consideradas as características clínicas relativas à idade, à etnia, ao índice de massa corpórea (IMC), à ocorrência de diabetes melito (DM) e hipertensão arterial sistêmica (HAS); à idade da menarca, primeira gestação e menopausa; à lactação, ao uso de contraceptivos hormonais e terapia de reposição hormonal; ao tabagismo e ao etilismo. Em relação ao tumor, foram considerados: o tipo histológico (carcinoma invasivo NST ou outro), o grau histológico (I, II, III), o grau nuclear (I, II ou III), o estágio TNM (I, II, III ou IV), o estadió clínico (I, II, III e IV) e a expressão de receptores de estrógeno e progesterona. Os dados clínicos do grupo controle foram coletados por meio de questionário específico, sendo descritos a idade e história pessoal ou familiar para o CM esporádico, hereditário e/ou familiar.

4.4. Análise Estatística

Primeiramente, foi verificado pelo programa *G-Power* 3.1⁷⁴ se o número total de participantes possuía poder amostral de 95% com erro alfa de 0,05, considerando a menor frequência alélica encontrada. Em seguida, verificou-se pelo programa OEGE^{®75} se os polimorfismos estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos grupos CM esporádico e controle.

A análise estatística foi realizada pelo *software* SPSS (i.e. *Statistical Package for the Social Sciences*) vs21.0.⁷⁶ O teste χ^2 foi empregado para avaliar a diferença na distribuição dos dados, verificando a frequência genotípica e gênica dos polimorfismos entre os grupos CM esporádico e controle.

Para as variáveis clínicas incluídas no estudo foram realizados os testes estatísticos de acordo com a categoria e distribuição dos dados. Dados numéricos com distribuição normal foram avaliados pelo teste T de *student* ou Análise de Variância de uma Via, de acordo com o número de genótipos e/ou agrupamento dos mesmos, caso ocorresse

distribuição não normal, os equivalentes estatísticos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram considerados. Já as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste χ^2 ou Exato de Fisher, dependendo do genótipo e/ou agrupamento dos mesmos. Para as análises com *p-value* significativo ($p < 0,05$) foi calculado o *Odds Ratio* pelo programa OpenEpi^{® 77}.

Com o objetivo de aprimorar as análises, foram realizados agrupamentos para os genótipos de cada polimorfismo e também para algumas variáveis clínicas (**Tabelas 9 e 10**).

Além da análise de associação, foi realizada a interação gênica entre os polimorfismos pelo *software Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR), o qual é um modelo não paramétrico e de interação não linear entre fatores genéticos e ambientais.^{78,79} Para ajustar as múltiplas comparações, foi realizado o teste MDR *permutation test* em nossa amostra, totalizando 10.000 permutações.

Tabela 9. Agrupamentos dos genótipos para análise dos polimorfismos nos genes *ESR1*, *ESR2* e *MTHFR*.

Gene	Polimorfismo	Agrupamentos
<i>ESR1</i>	c.2014G>A	GG vs GA+AA
		AA vs GA+GG
		GA vs GG+AA
<i>ESR2</i>	c.1730G>A	GG vs GA+AA
		AA vs GA+GG
		GA vs GG+AA
<i>MTHFR</i>	c.677C>T	CC vs CT+TT
		TT vs CT+CC
		CT vs CC+TT
	c.1298A>C	AA vs AC+CC
		CC vs AC+AA
		AC vs AA+CC

ESR1, Estrogen Receptor 1; *ESR2*, Estrogen Receptor 2; *MTHFR*, Methylene tetrahydrofolate Reductase.

Tabela 10. Variáveis clínicas com agrupamento dos dados para associação com os polimorfismos.

Variável clínica	Agrupamento
Etnia	caucasóide não caucasóide
Idade da menarca	≤ 12 anos > 12 anos
Idade da primeira gestação (G1)	< 20 anos 20 a 30 anos > 30 anos
Idade da menopausa	≤ 50 anos > 50 anos
IMC	18,6 a 24,9 25,0 a 29,9 ≥ 30
Tipo histológico (do tumor)	carcinoma NST Outros

IMC, índice de massa corpórea; NST, *no special type*.

5. RESULTADOS

O número total de participantes (510, sendo 253 pacientes e 257 controles) possui poder amostral superior a 95% para o erro alfa de 0,05, considerando a frequência do alelo A no polimorfismo c.2014G>A (0,21). Dentre os polimorfismos avaliados, esse alelo foi o menos frequente.

Os polimorfismos c.1730G>A, c.677T>C e c.1298A>C estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos grupos de pacientes e controles. Enquanto que o c.2014G>A está fora do equilíbrio nos dois grupos ($p < 0,001$). A distribuição genotípica está representada na **Tabela 11**.

Tabela 11. Distribuição genotípica dos polimorfismos c.2014G>A no gene *ESR1*, c.1730G>A no gene *ESR2*, c.677C>T e c.1298A>C no gene *MTHFR*.

Genótipos	Grupo		Total	Frequencia genotípica	Frequência alélica
	Pacientes	Controles			
c.2014G>A					
GG	167	175	342	0,67	G (0,28)
GA	57	63	120	0,23	A (0,22)
AA	29	19	48	0,10	
c.1730G>A					
GG	97	109	206	0,40	G (0,64)
GA	129	115	244	0,48	A (0,36)
AA	31	29	60	0,12	
c.677C>T					
CC	111	120	231	0,45	C (0,67)
CT	119	103	222	0,44	T (0,33)
TT	27	30	57	0,11	
c.1298A>C					
AA	133	135	268	0,52	A (0,73)
AC	112	104	216	0,42	C (0,27)
CC	12	14	26	0,05	

5.1. Caracterização da amostra

A média de idade das pacientes foi de $62,88 \pm 9,18$ anos (51 a 89 anos), enquanto que no grupo controle foi de $56,59 \pm 5,91$ anos (50 a 89 anos). Foi verificado que 73,1% das pacientes apresentavam sobrepeso com IMC (índice de massa corporal) $>25,0$ (kg/m^2), no entanto, não eram tabagistas (78,2%) ou etilistas (99,6%). A ocorrência de comorbidades como HAS e DM foi de 57,7% e 18,6%, respectivamente. Em relação à etnia, houve prevalência de caucasoides (87,4%) (**Tabela 12**).

Considerando as características do estilo de vida reprodutivo, 82,2% das pacientes encontravam-se na menopausa sendo que em 52,6% esta ocorreu antes dos 50 anos de idade. Apesar disso, 93,3% não realizou terapia de reposição hormonal. A maioria teve filhos (88,5%) em idade inferior aos 30 anos (77,1%), amamentaram suas crianças (69,8%) e não utilizaram anticoncepcionais hormonais ao longo da vida (93,3%) (**Tabela 13**).

A maioria dos tumores foi carcinoma invasivo NST (68,5%), de grau histológico G3 (70,8%) e grau nuclear III (55,3%). Os receptores de estrógeno e progesterona apresentaram positividade em 64,4% e 56,9% dos tumores, respectivamente. Houve distribuição semelhante para os estadios clínicos I (27,0%), II (29,8%) e III (32,5%) (**Tabelas 14 e 15**).

Tabela 12. Caracterização geral dos pacientes com CM que compõem a casuística.

Características		Frequência	
Idade	62,88 ± 9,18; 61,50 (51-89)*		
Raça			
Caucasoide	221	87,4%	
Não caucasóide	32	12,6%	
IMC (kg/m²)	28,71 ± 6,17; 27,47 (17,97-55,89)*		
≤ 18,5	4	1,6%	
18,6 - 24,9	64	25,3%	
25,0 - 29,9	101	39,9%	
≥ 30,0	78	30,8%	
Não informado	6	2,4%	
HAS			
Presença	146	57,7%	
Ausência	106	41,9%	
Não informado	1	0,4%	
DM			
Presença	47	18,6%	
Ausência	155	61,3%	
Não informado	51	20,2%	
Tabagista			
Sim	55	21,7%	
Não	198	78,3%	
Etilista			
Sim	1	0,4%	
Não	252	98,6%	

IMC, índice de massa corporal; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes melito.

*média ± desvio padrão, mediana (intervalo)

Tabela 13. Caracterização das pacientes quanto ao estilo de vida reprodutivo.

Características	Frequência	
Menarca	13 ± 1,8; 13 (9-19)*	
≤ 12 anos	105	41,5%
> 12 anos	147	58,1%
Não informado	1	4,0%
Menopausa		
Sim	208	82,2%
Não	30	11,9%
Não informado	15	5,9%
Idade da menopausa	48,6 ± 4,8; 50 (30-62)*	
≤ 50 anos	133	52,6%
> 50 anos	73	28,9%
Não informado	47	18,6%
Gestações		
Sim	224	88,5%
Não	29	11,5%
Idade da primeira gestação	22,8 ± 5,4; 22(12-40)*	
< 20 anos	71	28,1%
20-30 anos	124	49,0%
> 30 anos	29	11,5%
Não informado	29	11,5%
Uso de contraceptivo oral		
Sim	17	6,7%
Não	236	93,3%
Lactação		
Sim	177	69,8%
Não	76	30,2%
Terapia de reposição hormonal		
Sim	17	6,7%
Não	236	93,3%

*média ± desvio padrão, mediana (intervalo)

Tabela 14. Características gerais dos tumores.

Características	Número de casos	Frequência
Tipo histológico		
Carcinoma invasivo NST	176	69,5%
Outro	79	30,5%
Grau histológico		
G1	6	2,4%
G2	26	10,3%
G3	179	70,8%
Não informado	42	16,6%
Grau nuclear		
I	1	0,4%
II	89	35,2%
III	139	55,3%
Não informado	23	9,1%
Receptor de estrógeno		
Positivo	163	64,4%
Negativo	68	26,9%
Não informado	22	8,7%
Receptor de progesterona		
Positivo	144	56,9%
Negativo	89	35,2%
Não informado	20	7,9%

NST, *no special type*.

Tabela 15. Classificação TNM dos tumores e estadio clínico.

	Número de casos	Frequência
Tamanho do tumor (T)		
T0	4	1,6%
T1	87	34,5%
T2	80	31,7%
T3	12	4,8%
T4	54	21,4%
Não informado	15	6%
Linfonodos regionais (N)		
N0	141	56%
N1	52	20,5%
N2	44	17,5%
N3	15	6%
Metástases à distância (M)		
M0	241	95,6%
M1	11	4,4%
Estadio Clínico		
0	18	7,1%
I	68	27%
II	75	29,8%
III	82	32,5%
IV	8	3,2%
Não informado	1	0,4%

5.2. Polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2*

Não foi observada diferença entre os grupos de pacientes e controles em relação à ocorrência de CM esporádico para os polimorfismos c.2014G>A no gene *ESR1* ($p=0,281$) e c.1730G>A no gene *ESR2* ($p=0,241$). O mesmo foi observado nos agrupamentos GG *vs* GA+AA ($p=0,572$; $p=0,891$), AA *vs* GA+GG ($p=0,130$; $p=0,289$) e GA *vs* GG+AA ($p=0,604$; $p=0,464$) para c.2014G>A e c.1730G>A, respectivamente.

Ao associar o SNP c.2014G>A às variáveis clínicas categóricas, observou-se diferença em relação ao status de expressão do RE no tecido tumoral ($p=0,036$) (**Tabela 16**), sendo que o alelo A teve menor prevalência naqueles tumores que apresentavam expressão do RE positiva ($p=0,015$; OR=0,469; 95% IC=0,262–0,841) (**Tabela 17**). Houve diferença significativa na distribuição dos genótipos em estadios clínicos ($p=0,024$), onde o

alelo A foi associado à proteção do estadio 0 em relação aos demais por estar mais prevalente nesse grupo (OR=3,911; 95% IC=1,394–10,97) (**Tabela 18**). Foi encontrada associação entre o c.2014G>A e o tabagismo entre as pacientes (p=0,018), no entanto, tal achado foi desconsiderado por não possuir correlação biológica.

Tabela 16. Polimorfismo c.2014G>A no gene *ESR1* versus status de expressão de RE.

<i>ESR1</i> c.2014G>A	Expressão de RE		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
AA	18 (11)	11 (16)	29 (13)	0,036	1	-
GA	30 (18)	21 (30)	51 (22)		0,873	0,343 – 2,223
GG	115 (71)	36 (54)	151 (65)		1,952	0,844 – 4,514
Total	163	68	231			

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; RE, receptor de estrógeno; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Tabela 17. Polimorfismo c.2014G>A no gene *ESR1* versus status de expressão de RE, considerando o agrupamento dos genótipos.

<i>ESR1</i> c.2014G>A	Expressão de RE		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
GA+AA	48 (29)	32 (46)	80 (35)	0,015	0,469	0,262 – 0,841
GG	115 (71)	36 (54)	151 (65)		1	-
Total	163	68	231			

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; RE, receptor de estrógeno; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Tabela 18. Polimorfismo c.2014G>A no gene *ESR1* versus estadiamento do CM, considerando o agrupamento dos genótipos.

<i>ESR1</i> c.2014G>A						
Estadio	GA+AA (%)	GG (%)	Total (%)	p-value	OR	95% IC
0	11 (13)	6 (3)	17 (6)	0,024	3,911	1,394 – 10,97
I	20 (23)	49 (30)	69 (28)		0,824	0,447 – 1,520
II	20 (23)	55 (33)	75 (30)		0,582	0,299 – 1,130
III	33 (38)	50 (31)	83 (33)		1,980	0,377 – 10,41
IV	2 (3)	6 (3)	8 (3)		0,635	0,125 – 3,240
Total	86	166	252			

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Quanto às variáveis numéricas, o polimorfismo c.2014G>A foi associado à porcentagem de expressão do RE ($p=0,035$) quando considerado GA vs GG+AA, com o genótipo GA apresentando valores de expressão inferiores [63,50 $\pm$ 17,52, 70 (20-90)] à GG+AA [68,65 $\pm$ 23,88, 80 (5-100)] (**Figura 11**). Houve também associação com a porcentagem de expressão do RP ($p=0,018$) onde o genótipo GG [68,12 $\pm$ 24,67, 80 (5-100)] apresentou valores de expressão superiores aos genótipos GA+AA [66,60 $\pm$ 18,15, 70 (20-95)] (**Figura 12**).

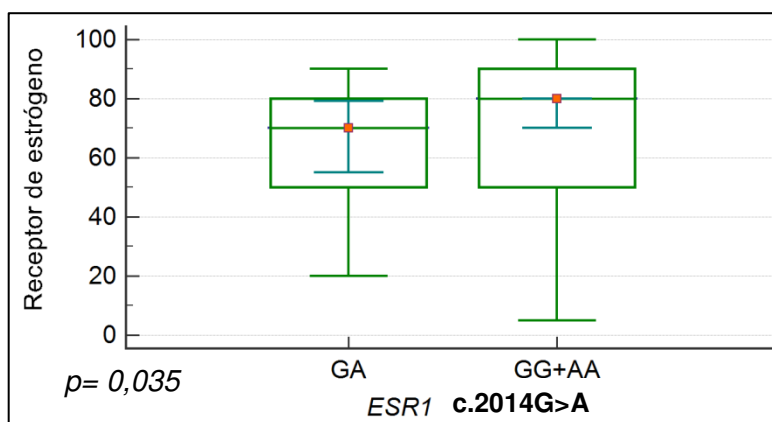


Figura 11. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.2014G>A. *ESR1*, *Estrogen Receptor 1*.

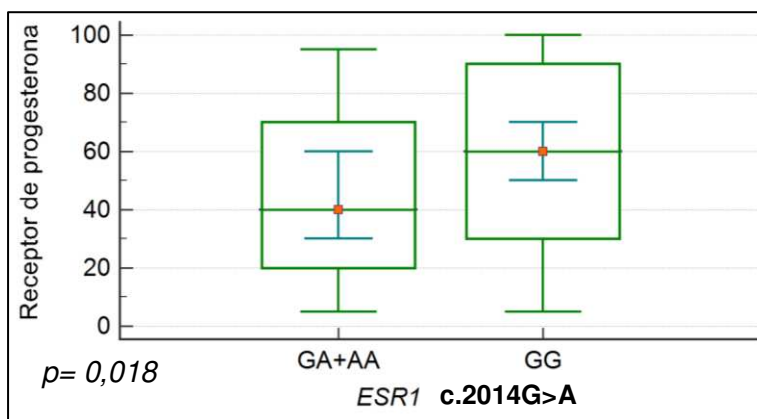


Figura 12. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RP em função dos genótipos para o SNP c.2014G>A. *ESR1*, *Estrogen Receptor 1*.

Ao associar o SNP c.1730G>A às variáveis clínicas categóricas, observou-se diferença significativa em relação à lactação ($p=0,023$), onde o genótipo GA foi o mais prevalente entre as mulheres que amamentaram (OR=2,257; 95% IC=1,254–4,061) (**Tabela 19**). O mesmo foi observado ao agrupar os genótipos GA+AA *vs* GG ($p=0,013$; OR=2,028; 95% IC=1,176–3,497) (**Tabela 20**) e GA *vs* GG+AA ($p=0,009$; OR=2,110; 95% IC=1,203–3,702) (**Tabela 21**).

Tabela 19. Polimorfismo c.1730G>A no gene *ESR2* *versus* o status de lactação.

<i>ESR2</i> c.1730G>A	Lactação		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
AA	20 (11)	9 (12)	29 (11)	0,023	1,393	0,580 – 3,346
GA	90 (51)	25 (33)	115 (46)		2,257	1,254 – 4,061
GG	67 (37)	42 (55)	109 (43)		1	-
Total	177	76	253			

ESR2, Estrogen Receptor 2; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Tabela 20. Polimorfismo c.1730G>A no gene *ESR2* *versus* o status de lactação, com o genótipo GG em evidência.

<i>ESR2</i> c.1730G>A	Lactação		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
GA+AA	110 (63)	34 (45)	144 (57)	0,013	2,028	1,176 – 3,497
GG	67 (37)	42 (55)	109 (43)		1	-
Total	177	76	253			

ESR2, Estrogen Receptor 2; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Tabela 21. Polimorfismo c.1730G>A no gene *ESR2* *versus* o status de lactação, com o genótipo GA em evidência.

<i>ESR2</i> c.1730G>A	Lactação		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
GA	90 (51)	25 (33)	115 (45)	0,009	2,110	1,203 – 3,702
GG+AA	87 (49)	51 (67)	138 (55)		1	-
Total	177	76	253			

ESR2, Estrogen Receptor 2; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Foram encontrados resultados significativos também para HAS ($p=0,031$) e estadiamento da doença ($p=0,009$). Em relação à presença de HAS, o genótipo GA foi menos prevalente ($OR=0,578$; 95% IC=0,339–0,987) (**Tabela 22**), inclusive ao agrupar GA vs GG+AA ($p=0,015$; $OR=0,530$; 95% IC=0,319–0,880) (**Tabela 23**). Enquanto que, para os estadios clínicos, o genótipo GA conferiu proteção do estadio 0 em relação aos demais sendo mais prevalente nesse grupo ($OR=4,383$; 95% IC=1,606–11,96) (**Tabela 24**).

A associação positiva entre o c.1730G>A e a raça ($p=0,007$), inclusive ao considerar caucasoides e não caucasoides ($p=0,007$), foi desconsiderada visto à miscigenação encontrada na população brasileira e à ausência de investigação de marcadores de ancestralidade.

Tabela 22. Polimorfismo c.1730G>A no gene *ESR2* versus a presença ou ausência de HAS.

<i>ESR2</i> c.1730G>A	HAS		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
AA	21(14)	8 (8)	29 (12)	0,031	1,544	0,626 – 3,810
GA	57 (39)	58 (55)	115 (46)		0,578	0,339 – 0,987
GG	68 (47)	40 (37)	108 (43)		1	-
Total	146	106	252			

ESR2, Estrogen Receptor 2; HAS, hipertensão arterial sistêmica; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Tabela 23. Polimorfismo c.1730G>A no gene *ESR2* versus a presença ou ausência de HAS, considerando o agrupamento dos genótipos.

<i>ESR2</i> c.1730G>A	HAS		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
GA	57 (39)	58 (55)	115 (46)	0,015	0,530	0,319 – 0,880
GG+AA	89 (61)	48 (45)	137 (54)		1	-
Total	146	106	252			

ESR2, Estrogen Receptor 2; HAS, hipertensão arterial sistêmica; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Tabela 24. Polimorfismo c.1730G>A no gene *ESR2* versus estadiamento do CM, considerando o agrupamento dos genótipos.

<i>ESR2</i> c.1730G>A						
Estadio	GA (%)	GG+AA (%)	Total (%)	p-value	OR	95% IC
0	9 (16)	8 (5)	17	0,009	4,383	1,606 – 11,96
I	12 (21)	57 (29)	69		0,760	0,369 – 1,568
II	12 (21)	63 (32)	75		0,532	0,245 – 1,153
III	23 (40)	60 (31)	83		2,683	0,313 – 23,03
IV	1 (2)	7 (4)	8		0,480	0,058 – 3,981
Total	57	195	252			

ESR2, *Estrogen Receptor 2*; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Para as demais variáveis clínicas, tanto categóricas quanto numéricas, não foram encontrados resultados significativos para c.2014G>A e c.1730G>A (**Tabelas 25, 26, 27 e 28**).

Tabela 25. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.2014G>A e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.

Polimorfismo c.2014G>A gene <i>ESR1</i>				
	GG/GA/AA	GG vs GA+AA	AA vs GA+GG	GA vs GG+AA
vs Grupo Controle	0,281	0,572	0,13	0,604
Raça	0,842	0,992	0,611	0,708
Raça (grupo)	0,502	1	0,561	0,496
Menarca (grupo)	0,971	0,893	1	0,879
Menopausa (status)	0,970	0,84	0,77	1
Menopausa (grupo)	0,693	0,878	0,506	0,727
Gestação (status)	0,713	0,836	0,547	0,815
Gestação (grupo)	0,214	0,72	0,102	0,367
ACOH	0,338	0,188	0,702	0,375
Lactação	0,488	0,47	0,288	1
TRH	0,643	1	0,702	0,547
Tabagismo	0,018	0,053	0,014	0,856
IMC (grupo)	0,804	0,653	0,754	0,606
HAS	0,147	0,226	0,071	1
DM	0,641	0,593	0,395	1
Tipo histológico	0,174	0,886	0,092	0,331
GH	0,373	0,178	0,942	0,15
GN	0,879	0,673	0,688	0,848
T	0,749	0,831	0,657	0,543
N	0,657	0,569	0,758	0,373
M	0,756	1	0,366	1
Estadio	0,072	0,024	0,999	0,009
RE (status)	0,036	0,015	0,284	0,055
RP (status)	0,197	0,256	0,838	0,076

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; ACOH, anticoncepcional hormonal; TRH, terapia de reposição hormonal; IMC, índice de massa corporal; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes melito; GH, grau histológico; GN, grau nuclear; T, tamanho; N, metástase em linfonodos regionais; M, metástases à distância.

Tabela 26. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1730G>A e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.

Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i>				
	GG/GA/AA	GG vs GA+AA	AA vs GA+GG	GA vs GG+AA
vs Grupo Controle	0,241	0,891	0,289	0,464
Raça	0,007	0,835	0,021	0,037
Raça (grupo)	0,007	1	0,014	0,02
Menarca (grupo)	0,609	0,432	1	0,681
Menopausa (status)	0,435	0,353	0,846	0,561
Menopausa (grupo)	0,467	0,816	0,38	0,608
Gestação (status)	0,845	0,348	0,433	0,5
Gestação (grupo)	0,618	0,951	0,575	0,873
ACOH	1	1	1	0,987
Lactação	0,013	1	0,009	0,023
TRH	0,616	0,424	1	0,646
Tabagismo	1	0,473	0,646	0,671
IMC (grupo)	0,182	0,724	0,057	0,236
HAS	0,197	0,111	0,015	0,031
DM	0,313	0,298	0,868	0,354
Tipo histológico	0,494	1	0,496	0,698
GH	0,658	0,916	0,736	0,915
GN	0,626	0,839	0,56	0,832
T	0,779	0,423	0,332	0,542
N	0,53	0,184	0,498	0,336
M	0,36	0,119	1	0,204
Estadio	0,276	0,178	0,562	0,258
RE (status)	0,384	0,645	0,664	0,597
RP (status)	0,276	0,134	0,893	0,225

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; ACOH, anticoncepcional hormonal; TRH, terapia de reposição hormonal; IMC, índice de massa corporal; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes melito; GH, grau histológico; GN, grau nuclear; T, tamanho; N, metástase em linfonodos regionais; M, metástases à distância.

Tabela 27. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.2014G>A e as variáveis clínicas numéricas, utilizando o teste Mann-Whitney.

Polimorfismo c.2014G>A no gene <i>ERS1</i>				
	GG/GA/AA	GG vs GA+AA	AA vs GA+GG	GA vs GG+AA
Idade	0,402	0,846	0,29	0,304
Menarca (idade)	0,606	0,606	0,729	0,396
Gestação (idade)	0,41	0,845	0,235	0,48
Menopausa (idade)	0,477	0,224	0,53	0,369
IMC	0,51	0,254	0,692	0,319
RE%	0,105	0,153	0,571	0,035
RP%	0,058	0,018	0,3	0,056

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; IMC, índice de massa corporal; RE%, porcentagem de expressão do receptor de estrogênio; RP%, porcentagem de expressão do receptor de progesterona.

Tabela 28. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1730G>A e as variáveis clínicas numéricas, utilizando o teste Mann-Whitney.

Polimorfismo c.1730G>A no gene <i>ESR2</i>				
	GG/GA/AA	GG vs GA+AA	AA vs GA+GG	GA vs GG+AA
Idade	0,134	0,052	0,283	0,212
Menarca (idade)	0,649	0,76	0,353	0,77
Gestação (idade)	0,72	0,55	0,732	0,42
Menopausa (idade)	0,519	0,537	0,469	0,286
IMC	0,651	0,463	0,444	0,808
RE%	0,433	0,334	0,596	0,197
RP%	0,553	0,277	0,694	0,427

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; IMC, índice de massa corporal; RE%, porcentagem de expressão do receptor de estrogênio; RP%, porcentagem de expressão do receptor de progesterona.

5.2.1. Análise de combinação dos genes *ESR1* e *ESR2*

Não houve diferença na distribuição dos agrupamentos para os polimorfismos c.2014G>A e c.1730G>A entre os grupos de pacientes e controles (**Tabela 29**), inclusive considerando a combinação que conferiria maior proliferação celular (GG/AA) *versus* os demais.

Tabela 29. Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos c.2014G>A (gene *ESR1*) e c.1730G>A (gene *ESR2*).

Haplótipos <i>ESR1/ESR2</i>	Grupo		Total
	Pacientes (%)	Controles (%)	
GG/GG	78 (53)	70 (47)	148
GG/GA	70 (45)	86 (55)	156
GG/AA	19 (50)	19 (50)	38
GA/GG	22 (54)	19 (46)	41
GA/GA	30 (47)	34 (53)	64
GA/AA	5 (33)	10 (67)	15
AA/GG	9 (53)	8 (47)	17
AA/GA	15 (63)	9 (37)	24
AA/AA	5 (71)	2 (29)	7

ESR1, Estrogen Receptor 1; ESR2, Estrogen Receptor 2.

Ao associar o agrupamento GG/GG (sem a variante rara para ambos os polimorfismos) às variáveis clínicas, este foi menos prevalente no grupo de pacientes que amamentaram suas crianças ($p=0,027$; $OR=0,525$; $95\% \text{ IC}=0,298-0,924$) (**Tabela 30**) e esteve associado à maior expressão de RP no tecido tumoral ($62,31 \pm 28,81$, 70) em relação aos demais haplótipos ($49,43, \pm 29,11$, 50) (**Figura 13**).

Tabela 30. Associação do agrupamento GG/GG (c.2014G>A e c.1730G>A) e lactação entre as pacientes.

Combinação <i>ESR1/ESR2</i>	Lactação		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
GG/GG	47 (27)	31 (41)	78 (31)	0,027	0,525	0,298 – 0,924
demais	130 (73)	45 (59)	175 (69)		1	-
Total	177	76	253			

ESR1, Estrogen Receptor 1; *ESR2*, Estrogen Receptor 2; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

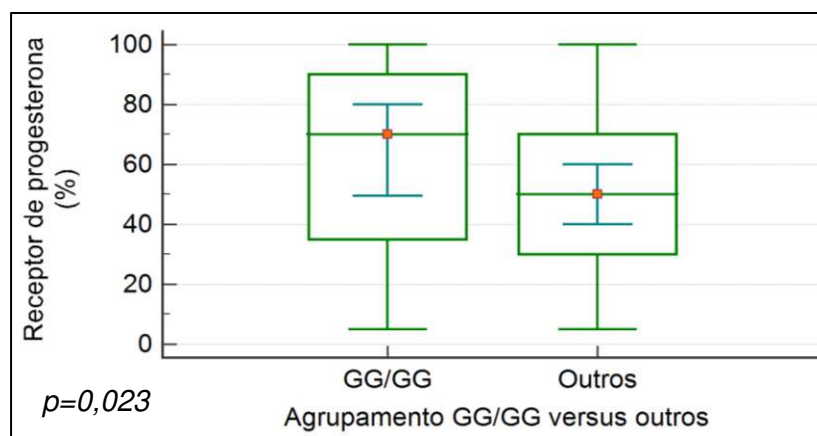


Figura 13. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RP em função do grupo GG/GG.

5.3. Polimorfismos no gene *MTHFR*

Não foi observada diferença significativa entre os grupos de pacientes e controles em relação à ocorrência de CM esporádico para os polimorfismos c.677C>T ($p=0,443$) e c.1298A>C ($p=0,805$) no gene *MTHFR*. O mesmo foi observado nos agrupamentos CC vs CT+TT ($p=0,374$), TT vs CT+CC ($p=0,674$) e CT vs CC+TT ($p=0,246$) para c.677C>T, e AA vs AC+CC ($p=0,724$), CC vs AC+AA ($p=1,000$) e AC vs AA+CC ($p=0,592$) para c.1298A>C.

Ao associar o SNP c.677C>T às variáveis clínicas categóricas, observou-se diferença em relação à ocorrência de metástase à distância ($p=0,028$), sendo que o genótipo CC foi mais prevalente no grupo de pacientes com metástase (OR=5,311; 95% IC=1,124–

25,09), indicando um maior risco (**Tabela 31**). Resultado semelhante foi obtido ao agrupar CC+TT vs CT (p=0,031) (**Tabela 32**).

Houve diferença na distribuição dos genótipos de c.677C>T em estádios clínicos (p=0,028), no entanto, a distribuição dos dados e o tamanho da amostra não permitiu o cálculo de *Odds Ratio* válido (**Tabela 33**).

Assim como para o polimorfismo c.1730G>A, houve associação positiva entre o c.677C>T e a raça (p=0,035), inclusive ao considerar caucasoides e não caucasoides (p=0,026), e o resultado foi desconsiderado devido à miscigenação encontrada na população brasileira e à ausência de marcadores de ancestralidade.

Tabela 31. Polimorfismo c.677C>T no gene *MTHFR* versus a presença ou ausência de metástase à distância (M), evidenciando o genótipo CC.

<i>MTHFR</i> c.677C>T	M		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
CC	9 (82)	111 (46)	120 (47)	0,028	5,311	1,124 – 25,09
CT+TT	2 (18)	131 (54)	133 (53)		1	-
Total	11	242	253			

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase gene*; M, metástase à distância; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Tabela 32. Polimorfismo c.677C>T no gene *MTHFR* versus a presença ou ausência de metástase à distância, evidenciando o genótipo CT.

<i>MTHFR</i> c.677C>T	M		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
CC+TT	10 (91)	140 (58)	150 (59)	0,031	7,286	0,918 – 57,81
CT	1 (9)	102 (42)	103 (41)		1	-
Total	11	242	253			

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase gene*; M, metástase à distância; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Tabela 33. Polimorfismo c.677C>T no gene *MTHFR* versus estadiamento do CM, considerando o agrupamento dos genótipos.

<i>MTHFR</i> c.677C>T						
Estadio	CC (%)	CT+TT (%)	Total (%)	p-value	OR	95% IC
0	6 (5)	11 (8)	17 (7)	0,028	1,698	0,608 – 4,742
I	38 (32)	31 (23)	69 (27)		0,672	0,382 – 1,182
II	28 (24)	47 (35)	75 (30)		1,793	0,962 – 3,343
III	40 (34)	43 (32)	83 (33)		7,525	0,886 – 63,89
IV	7 (5)	1 (2)	8 (3)		1,121	0,015 – 1,000
Total	119	133	252			

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase gene*; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Já o polimorfismo c.1298A>C, dentre as variáveis categóricas, foi associado apenas ao estadio clínico. Nesse caso, o genótipo AA esteve associado ao maior risco para estadios mais graves, visto que esteve menos prevalente no estágio 0 em relação aos demais (p=0,034; OR=0,211; 95% IC=0,067–0,669) (**Tabela 34**). O mesmo foi verificado ao comparar AA vs AC+CC e AC vs AA+CC, onde AC+CC (p=0,027; OR=4,094; 95% IC=1,297– 2,93) (**Tabela 35**) e AC (p=0,008; OR=5,236; 95% CI=1,656–16,55) (**Tabela 36**) foram mais prevalentes no estadio 0 em relação aos demais nos dois agrupamentos, respectivamente.

Tabela 34. Polimorfismo c.1298A>C no gene *MTHFR* versus estadiamento do CM.

<i>MTHFR</i> c.1298A>C							
Estadio	AA (%)	AC (%)	CC (%)	Total(%)	p-value	OR	95% IC
0	4 (3)	13 ¹ (13)	0 ⁶ (0)	17 (7)	0,034	*	*
I	41 (30)	22 ² (21)	6 ⁷ (43)	69 (27)			
II	36 (27)	35 ³ (34)	4 ⁸ (29)	75 (30)			
III	51 (38)	29 ⁴ (28)	3 ⁹ (21)	83 (33)			
IV	3 (2)	4 ⁵ (4)	1 ¹⁰ (7)	8 (3)			
Total	135	103	14	252			

MTHFR, *methylenetetrahydrofolate reductase gene*; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

* ¹ OR= 0,211; 95% IC= 0,067 – 0,669

² OR= 1,408; 95% IC= 0,768 – 2,582

³ OR= 0,629; 95% IC= 0,33 – 1,187

⁴ OR= 2,345; 95% IC= 0,490 – 11,21

⁵ OR= 0,562; 95% IC= 0,123 – 2,57

⁶ Não calculado devido ao número 0 de CC no estadio 0

⁷ OR= 0,607; 95% IC= 0,198 – 1,863

⁸ OR= 0,667; 95% IC= 0,157 – 2,838

⁹ OR= 5,667; 95% IC= 0,445 – 72,21

¹⁰ OR= 0,296; 95% IC= 0,029 – 3,048

Tabela 35. Polimorfismo c.1298C>T no gene *MTHFR* versus estadiamento do CM, evidenciando o genótipo AA.

<i>MTHFR</i> c.1298A>C						
Estadio	AA (%)	AC+CC (%)	Total (%)	p-value	OR	95% IC
0	4 (3)	13 (11)	17 (7)	0,027	4,094	1,297 – 12,93
I	41 (30)	28 (24)	69 (27)		0,809	0,458 – 1,429
II	36 (27)	39 (33)	75 (30)		1,581	0,854 – 2,929
III	51(38)	32 (27)	83 (33)		0,377	0,084 – 1,684
IV	3 (2)	5 (5)	8 (3)		1,964	0,459 – 8,401
Total	135	117	252			

MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase gene; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Tabela 36. Polimorfismo c.1298C>T no gene *MTHFR* versus estadiamento do CM, evidenciando o genótipo AC.

<i>MTHFR</i> c.1298A>C						
Estadio	AA+CC (%)	AC (%)	Total (%)	p-value	OR	95% IC
0	4 (3)	13 (13)	17 (7)	0,008	5,236	1,656 – 16,55
I	47 (32)	22 (21)	69 (27)		0,675	0,373 – 1,221
II	40 (27)	35 (34)	75 (30)		1,538	0,825 – 2,808
III	54 (35)	29 (28)	83 (33)		0,537	0,125 – 2,307
IV	4 (3)	4 (4)	8 (3)		1,465	0,358 – 5,994
Total	149	103	252			

MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase gene; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Em relação às variáveis numéricas, houve associação com a porcentagem de expressão do RE para os dois polimorfismos no gene *MTHFR* [c.677C>T (p=0,020) e

c.1298A>C ($p=0,009$)). No c.677C>T o genótipo CC foi associado à menor expressão de RE [$62,67 \pm 24,41$, 70 (5-100)] comparado ao CT [$71,02 \pm 21,31$, 80 (5-100)] e TT [$75,53 \pm 17,70$, 80 (30-100)] (**Figura 14**). Enquanto para o c.1298A>C o genótipo AA apresentou maior expressão de RE [$71,20 \pm 21,06$, 80 (5-100)] comparado ao AC [$65,76 \pm 23,14$, 70 (5-100)] e CC [$43,57 \pm 26,88$, 50 (7-70)] (**Figura 15**), com resultado semelhante ao considerar o agrupamento AA vs AC+CC (**Figura 16**).

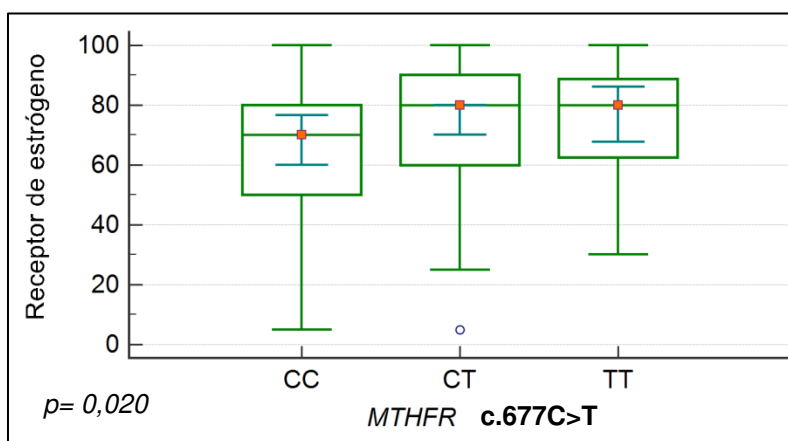


Figura 14. Porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.677C>T.
MTHFR, Metylenetetrahydrofolate Reductase.

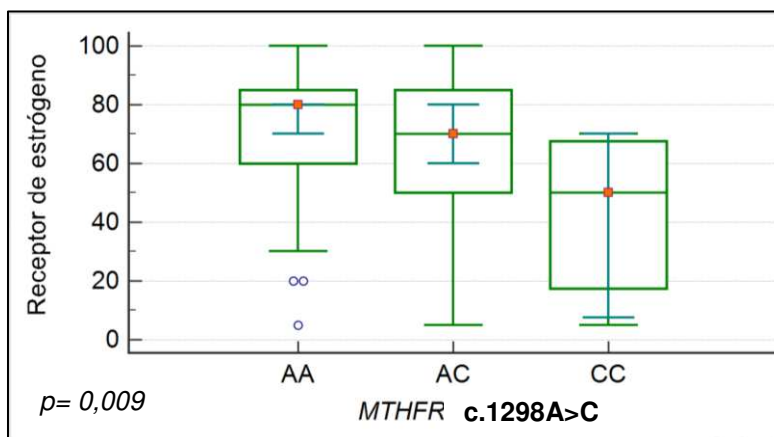


Figura 15. Porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.1298A>C.
MTHFR, Metylenetetrahydrofolate Reductase.

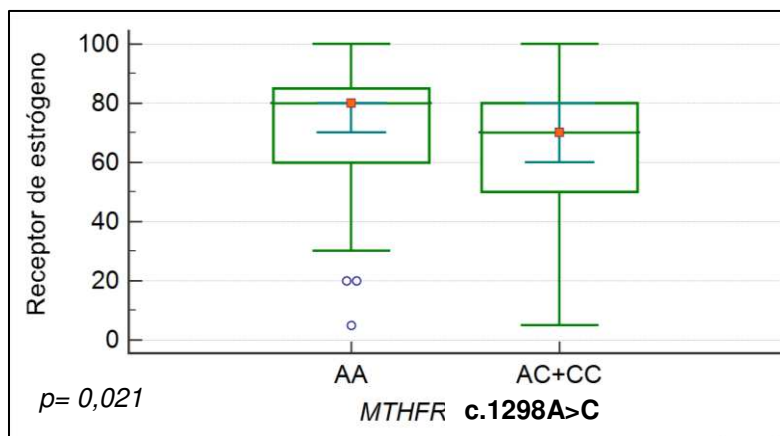


Figura 16. Distribuição das amostras de pacientes quanto à porcentagem de expressão do RE em função dos genótipos para o SNP c.1298A>C (AA vs AC+CC).

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*.

Para as demais variáveis clínicas, tanto categóricas quanto numéricas, não foram encontrados resultados significativos para c.677C>T e c.1298A>C (Tabelas 37, 38, 39 e 40).

Tabela 37. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.677C>T e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.

Polimorfismo c.677T>C no gene <i>MTHFR</i>				
	CC/CT/TT	CC vs CT+TT	TT vs CT+CC	CT vs CC+TT
vs Grupo Controle	0,443	0,374	0,674	0,246
Raça	0,106	0,035	0,222	0,297
Raça (grupo)	0,026	0,013	0,143	0,129
Menarca (grupo)	0,926	1	0,842	0,897
Menopausa (status)	1	0,846	0,382	0,434
Menopausa (grupo)	0,85	0,771	0,651	1
Gestação (status)	0,272	0,432	0,358	0,16
Gestação (grupo)	0,858	0,599	0,882	0,62
ACOH	0,091	0,076	0,235	0,445
Lactação	0,85	0,681	1	0,676
TRH	0,291	0,208	1	0,201
Tabagismo	0,816	0,545	0,815	0,644
IMC (grupo)	0,369	0,186	0,347	0,617
HAS	0,158	0,609	0,071	0,604
DM	0,823	0,74	0,789	1
Tipo histológico	0,32	0,174	0,835	0,214
GH	0,824	0,65	0,588	0,884
GN	0,665	0,529	0,634	0,464
T	0,256	0,62	0,119	0,432
N	0,667	0,546	0,481	0,725
M	0,056	0,028	1	0,031
Estadio	0,095	0,028	0,65	0,05
RE (status)	1	1	1	1
RP (status)	0,723	0,5	0,838	0,584

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; ACOH, anticoncepcional hormonal; TRH, terapia de reposição hormonal; IMC, índice de massa corporal; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabete melito; GH, grau histológico; GN, grau nuclear; T, tamanho; N, metástase em linfonodos regionais; M, metástases à distância.

Tabela 38. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1298A>C e as variáveis clínicas categóricas, utilizando os testes χ^2 e Exato de Fisher.

Polimorfismo c.1298A>C no gene <i>MTHFR</i>				
	AA/AC/CC	AA vs AC+CC	CC vs AC+AA	AC vs AA+CC
vs Grupo Controle	0,805	0,724	1	0,592
Raça	0,99	0,864	0,848	0,903
Raça (grupo)	0,917	0,708	0,635	0,848
Menarca (grupo)	0,493	0,798	0,369	0,438
Menopausa (status)	0,502	0,701	0,366	1
Menopausa (grupo)	0,139	0,189	0,458	0,464
Gestação (status)	0,465	0,693	0,366	1
Gestação (grupo)	0,406	0,406	0,641	0,371
ACOH	0,269	0,208	1	0,445
Lactação	0,864	1	0,738	0,781
TRH	0,45	0,452	1	0,8
Tabagismo	0,214	0,542	0,465	0,174
IMC (grupo)	0,716	0,806	0,194	0,516
HAS	0,783	0,798	0,765	0,605
DM	0,644	0,41	1	0,401
Tipo histológico	0,149	0,058	0,744	0,075
GH	0,719	0,568	0,717	0,404
GN	0,393	0,617	0,343	0,624
T	0,744	0,649	0,915	0,399
N	0,955	0,75	0,888	0,686
M	0,499	0,356	0,393	0,367
Estadio	0,034	0,027	0,641	0,008
RE (status)	0,258	0,313	0,725	0,143
RP (status)	0,951	0,788	1	0,784

ESR1, *Estrogen Receptor 1*; ACOH, anticoncepcional hormonal; TRH, terapia de reposição hormonal; IMC, índice de massa corporal; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes melito; GH, grau histológico; GN, grau nuclear; T, tamanho; N, metástase em linfonodos regionais; M, metástases à distância.

Tabela 39. P-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.677C>T e as variáveis clínicas numéricas, utilizando o teste Mann-Whitney.

Polimorfismo c.677C>T no gene <i>MTHFR</i>				
	CC/CT/TT	CC vs CT+TT	TT vs CT+TT	CT vs CC+TT
Idade	0,727	0,842	0,512	0,526
Menarca (idade)	0,770	0,995	0,496	0,663
Gestação (idade)	0,926	0,789	0,854	0,699
Menopausa (idade)	0,696	0,528	0,746	0,397
IMC	0,504	0,366	0,701	0,242
RE%	0,020	0,006	0,135	0,076
RP%	0,856	0,958	0,613	0,696

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*; IMC, índice de massa corporal; RE%, porcentagem de expressão do receptor de estrógeno; RP%, porcentagem de expressão do receptor de progesterona.

Tabela 40. p-value para cada uma das análises realizadas, considerando os genótipos para o polimorfismo c.1298A>C e as variáveis clínicas numéricas, utilizando o teste Mann-Whitney.

Polimorfismo c.1298A>C no gene <i>MTHFR</i>				
	AA/AC/CC	AA vs AC+CC	CC vs AC+AA	AC vs AA+CC
Idade	0,275	0,255	0,124	0,612
Menarca (idade)	0,947	0,875	0,621	0,787
Gestação (idade)	0,884	0,627	0,990	0,627
Menopausa (idade)	0,362	0,305	0,638	0,609
IMC	0,322	0,244	0,084	0,141
RE%	0,009	0,033	0,021	0,291
RP%	0,199	0,075	0,782	0,140

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*; IMC, índice de massa corporal; RE%, porcentagem de expressão do receptor de estrógeno; RP%, porcentagem de expressão do receptor de progesterona.

5.3.1. Análise do haplótipo c.677C>T e c.1298A>C

Não houve diferença na distribuição dos haplótipos para os polimorfismos c.677C>T e c.1298A>C no gene *MTHFR* entre os grupos de pacientes e controles (**Tabela 41**), inclusive considerando os haplótipos com menor atividade enzimática (TT/AA e CT/AC) *versus* os demais.

Tabela 41. Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos c.677C>T e c.1298^a>C no gene *MTHFR*.

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Grupo		Total
	Pacientes	Controles	
CC/AA	54 (59)	38 (41)	92
CC/AC	54 (47)	61 (53)	115
CC/CC	12 (50)	12 (50)	24
CT/AA	59 (46)	68 (54)	127
CT/AC	44 (46)	51 (54)	95
CT/CC	0 (0)	0 (0)	0
TT/AA	22 (45)	27 (55)	49
TT/AC	6 (100)	0 (0)	6
TT/CC	2 (100)	0 (0)	2

MTHFR, Methylenetetrahydrofolate Reductase.

Ao associar o haplótipo CC/AA (ausência da variante rara para ambos polimorfismos) às variáveis clínicas, este foi mais prevalente entre as pacientes que fizeram uso de contraceptivo hormonal ($p=0,013$; $OR=3,671$; 95% $IC=1,344-10,03$) (**Tabela 42**) e entre aquelas que apresentavam HAS ($p=0,043$; $OR=1,979$; 95% $IC=1,036-3,782$) (**Tabela 43**). O CC/AA foi menos prevalente no estadio II ($p=0,024$; $OR=0,429$; 95% $IC=0,190-0,968$) representando um fator de risco para os estadios mais graves (III e IV) (**Tabela 44**).

Tabela 42. Associação do haplótipo CC/AA (c.677C>T e c.1298A>C) e o uso de contraceptivo hormonal.

Haplótipo <i>MTHFR</i>	ACOH		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
CC/AA	8 (47)	46 (19)	54 (21)	0,013	3,671	1,344 – 10,03
demais	9 (53)	190 (81)	199 (89)		1	-
Total	17	236	253			

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*; ACOH, anticoncepcional hormonal; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Tabela 43. Associação do haplótipo CC/AA (c.677C>T e c.1298A>C) e HAS.

Haplótipo <i>MTHFR</i>	HAS		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	Sim (%)	Não (%)				
CC/AA	38 (26)	16 (15)	54 (21)	0,043	1,979	1,036 – 3,782
demais	108 (74)	90 (85)	198 (79)		1	-
Total	146	106	252			

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*; HAS, hipertensão arterial sistêmica; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Tabela 44. Associação do haplótipo CC/AA (c.677C>T e c.1298A>C) e o estadiamento do CM.

Estadio	Haplótipo <i>MTHFR</i>		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	CC/AA (%)	Demais (%)				
0	0 (0)	17 (8)	17 (6)	0,024	*	*
I	20 (37)	49 (25)	69 (27)		1,850	0,830 – 3,012
II	10 (19)	65 (33)	75 (30)		0,429	0,190 – 0,968
III	22 (41)	61 (31)	83 (33)		1,820	0,203 – 5,764
IV	2 (3)	6 (3)	8 (4)		1,231	0,241 – 6,277
Total	54	198	252			

MTHFR, *methylenetetrahydrofolate reductase gene*; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

*não foi possível o cálculo de *Odds Ratio*.

Ao considerar o haplótipo CT/AC *versus* os demais, foi observada diferença na distribuição dos tipos histológicos de CM, sendo que foi menos prevalente no grupo de carcinoma invasivo NST (p=0,032; OR=0,472; 95% IC=0,243–0,918) (**Tabela 45**). Esse haplótipo parece conferir proteção do estadio 0 em relação aos demais, visto que esteve mais prevalente nesse grupo (p=0,044; OR=3,476; 95% IC=1,341–10,47) (**Tabela 46**).

Tabela 45. Associação do haplótipo CT/AC (c.677C>T e c.1298A>C) e o tipo histológico de CM.

Haplótipo	Tipo histológico					
<i>MTHFR</i>	NST (%)	Outro (%)	Total (%)	p-value	OR	95% IC
CT/AC	24 (14)	20 (25)	44 (17)	0,032	0,472	0,243 – 0,918
demais	150 (86)	59 (75)	209 (83)		1	-
Total	174	79	252			

MTHFR, *Methylenetetrahydrofolate Reductase*; HAS, hipertensão arterial sistêmica; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

Tabela 46. Associação do haplótipo CT/AC (c.677C>T e c.1298A>C) e o estadiamento do CM.

Estadio	Haplótipo <i>MTHFR</i>		Total (%)	p-value	OR	95% IC
	CT/AC (%)	Demais (%)				
0	7 (16)	10 (5)	17 (7)	0,044	3,476	1,341 – 10,47
I	9 (20)	60 (29)	69 (27)		0,793	0,329 – 1,662
II	15 (34)	60 (29)	75 (27)		1,500	0,664 – 3,390
III	13 (30)	70 (34)	83 (33)		*	*
IV	0 (0)	8 (3)	8 (3)		*	*
Total	44	208	252			

MTHFR, *methylenetetrahydrofolate reductase gene*; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

*não foi possível o cálculo de *Odds Ratio*.

5.4. Interação gênica

Não houve interação gênica entre os genes *ESR1*, *ESR2* e *MTHFR* incluídos nesse estudo, considerando a distribuição dos polimorfismos c.2014G>A, c.1730G>A, c.677C>T e c.1298A>C.

6. DISCUSSÃO

O CM representa importante problema de saúde pública, sendo responsável por óbitos em mulheres em várias partes do mundo. É uma doença heterogênea com variabilidade das manifestações clínicas, fatores de risco e evolução da doença.^{2,6,7} Por esses motivos, nos últimos anos aumentou o número de pesquisas visando encontrar preditores de risco para a gravidade e resposta ao tratamento.^{25,43,61}

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi associar a ocorrência de CM esporádico, e variáveis clínicas, com os polimorfismos c.2014G>A e c.1730G>A nos genes dos receptores de estrógeno *ESR1* e *ESR2*, respectivamente; e com os polimorfismos c.677C>T e c.1298A>C no gene *MTHFR*, em mulheres da região sudeste do país.

6.1. Caracterização da amostra

Considerando a caracterização da amostra, o trabalho apresentou a maior média de idade entre as pacientes $62,88 \pm 9,18$ (51 a 89) sendo semelhante ao estudo de Ericson et al. (2009)⁷⁹ que selecionou mulheres acima de 55 anos. Nos demais estudos^{38,39,43,47,78-81} a maior média de idade foi de $49,9 \pm 11,4$ (17 a 78) sendo um grupo constituído por mulheres jovens³⁸ e, nesses casos, mutações herdadas no gene *BRCA1* poderiam ser responsáveis pelo desenvolvimento do CM, reduzindo ou anulando os efeitos dos polimorfismos no risco para a doença⁸². Isso poderia explicar os resultados divergentes entre diferentes estudos presentes na literatura.^{38,39,43,47,78-81}

Para os dados clínicos e laboratoriais considerados, houve semelhança com outras pesquisas quanto às variáveis clínicas de tipo histológico, expressão de receptores hormonais, grau histológico e nuclear tumorais, e distribuição quanto ao *status* da menopausa e paridade.^{43,44,83}

Não foram observados riscos associados à exposição ao estrógeno durante a vida reprodutiva feminina, já que houve maior proporção de pacientes que tiveram filhos, amamentaram, não utilizaram contraceptivos hormonais ou terapia de reposição hormonal,

e tiveram a menopausa antes dos 50 anos de idade.⁸ Portanto, é provável que fatores genéticos e outros ambientais tenham exercido maior influência para o desenvolvimento da doença.^{26,27}

A obesidade é um importante fator de risco para várias doenças, inclusive para o desenvolvimento de câncer em órgãos como mama, endométrio, cólon e rim.^{84,85} Isso porque o tecido adiposo é uma importante fonte de estrógeno devido à notável atividade da enzima aromatase, que converte andrógenos em estrógenos (principalmente o 17-beta-estradiol, o mais potente deles). Além disso, indivíduos obesos possuem níveis elevados de leptina, que estimula a proliferação celular e inibe a apoptose no tecido mamário, e baixos níveis de adiponectina que se liga a fatores de crescimento inibindo-os.⁸⁶ Portanto, a obesidade é um fator de risco presente na amostra estudada, visto que aproximadamente 70% das pacientes apresentava sobrepeso e mais de 30% delas estavam com o IMC acima de 30 kg/m².

6.2. Polimorfismos *versus* risco para CM

Os SNPs analisados não alteraram o risco para o desenvolvimento de CM, apresentando resultados semelhantes aos de outros autores,^{39,44,47,87,88} mas estiveram associados a variáveis clínicas distintas. Pesquisas revelam resultados conflitantes no estudo desses polimorfismos em diferentes populações. O alelo G para o c.2014G>A foi mais frequente no grupo de pacientes em relação ao grupo controle em estudo realizado na Tunísia,³⁸ enquanto os genótipos AA e GA aumentaram o risco para a doença em mulheres no norte da Índia.⁷¹ Em relação ao c.1730G>A no gene *ESR2*, Maguire et al. (2005)⁷⁸ detectaram efeito protetor do genótipo GA para CM em mulheres suecas, enquanto um consórcio envolvendo amostras de CM provenientes dos Estados Unidos e países da Europa não detectou relação entre CM e o polimorfismo c.1730G>A.⁴⁷

A frequência dos genótipos para o polimorfismo c.2014G>A está fora do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p < 0,001$) no grupo de pacientes e controles. O mesmo foi observado por Anghel et al. (2010)³⁹ em mulheres residentes na Romênia em estudo

envolvendo 103 pacientes e 114 controles. Isso pode estar ocorrendo devido à influência de algum fator evolutivo. Em contrapartida, nas demais pesquisas realizadas no Irã⁴³, Turquia⁸⁷, Taiwan⁴⁴, Tunísia³⁸ e Índia⁷¹ o SNP esteve em equilíbrio.

Já os polimorfismos c.677C>T e c.1298A>C no gene *MTHFR* alteraram o risco para diferentes tipos de câncer, inclusive CM, em diferentes populações.^{56,61,62,79-82,89,90} No entanto, sofrem influência da ingestão de folato^{64,91} e consumo de bebidas alcoólicas⁶⁰ e, por esses motivos, os estudos apresentam resultados discordantes sobre o efeito dos genótipos na modificação do risco. Como exemplo, Barbosa et al. (2012)⁸⁰ encontraram aumento no risco para o genótipo heterozigoto composto 677CT/1298AC em mulheres na menopausa residentes no estado do Ceará (Brasil). Enquanto na população chinesa o genótipo TT foi o responsável.⁸¹

Shrubsole et al. (2004)⁹¹ avaliaram os polimorfismos no gene *MTHFR* e a ingestão de folato em 1602 casos e 1724 controles residentes em Xangai (China) e verificaram aumento no risco de CM para o genótipo TT (c.677C>T) quando associado à baixa ingestão. Por outro lado, pesquisa realizada na cidade de São Paulo (Brasil) por Ma et al. (2008)⁶⁴, com 458 pacientes e 458 controles, o risco foi elevado para os genótipos AC e CC (c.1298A>C) e menor ingestão de folato, enquanto os genótipos CT e TT (c.677C>T) proporcionaram menor risco nas mesmas condições.

Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, Platek et al. (2009)⁶⁰ evidenciaram o aumento do risco para mulheres na menopausa e genótipo TT (c.677C>T) que ingeriram maiores quantidades de álcool ao longo da vida comparadas àqueles com genótipo CC e que não fizeram o uso. Isso se deve ao fato de o álcool promover a má absorção e aumento na excreção de folato proveniente da dieta, e interferir na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo.⁹²

Não foram avaliados o consumo de álcool e ingestão de folato entre as pacientes e controles que compõem a casuística. Dentre as 253 pacientes, apenas uma possuía dado positivo referente ao consumo de álcool sem especificar a quantidade e duração. Para melhor avaliar os efeitos do etilismo e ingestão de folato, seria necessária a aplicação de questionário específico em todas as participantes do estudo e dosagem de

folato no plasma sanguíneo. Por esses motivos, não podemos excluir a possibilidade de interferência desses dois fatores na relação entre os polimorfismos no gene *MTHFR* e o risco para CM.

6.3. Polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* versus variáveis clínicas

O estrógeno é responsável pela proliferação celular das glândulas mamárias durante a puberdade, gravidez e lactação, principalmente,³⁷ além de influenciar os sistemas neuroendócrino, esquelético e cardiovascular.³¹ As funções desse hormônio são mediadas por dois receptores, RE α e RE β , codificados por genes distintos, *ESR1* e *ESR2*.³¹

O RE α permanece expresso apenas nos períodos de puberdade, gravidez e lactação quando ocorre maior proliferação celular. Portanto, células da glândula mamária não expressam RE α em condições normais. Por outro lado, é abundantemente expresso em carcinomas invasivos e, na prática clínica, a expressão é detectada por IHQ e representa bom prognóstico.^{13,31,93}

Já o RE β possui expressão permanente nas células da glândula mamária e atua como supressor tumoral regulando, principalmente, os efeitos do RE α . Durante o período de lactação, os dois receptores estão expressos simultaneamente em 70% das células epiteliais mamárias.^{31,93}

No polimorfismo c.2014G>A no gene *ESR1* é suposto que a variante A reduza a expressão do receptor ER α e assim a atividade proliferativa.^{41,42} Enquanto que no polimorfismo c.1730G>A, é suposto que a variante A resulte na perda ou redução da função supressora tumoral levando à predisposição ao câncer.⁴⁶

Apesar de não estar relacionado diretamente ao risco de desenvolvimento de CM, o SNP c.2014G>A foi associado ao status de expressão do RE na IHQ (p=0,036), porcentagem de expressão do RE (p=0,024) e ao estadiamento da doença (p=0,035). Ao passo que, o c.1730G>A apresentou diferença na distribuição dos genótipos quanto à lactação (p=0,023), HAS (p=0,031) e estadiamento da doença (p=0,009).

Em relação à expressão RE no tecido tumoral, os resultados revelam que o alelo A pode estar associado à diminuição, visto que foi menos frequente nos tumores RE

positivos e o genótipo GA apresentou valores de expressão inferiores ao genótipo GG somado ao AA. Nesse caso, o genótipo AA (29/253) possui baixo efeito visto a relação com a proporção de genótipos GG (167/253).

Houve diferença na distribuição dos genótipos para c.2014G>A e c.1730G>A considerando o estadiamento da doença. Nessa associação, o alelo A (c.2014G>A) e o genótipo GA (c.1730G>A) conferiram proteção do estadio 0 em relação a estadios de maior gravidade, quando analisados individualmente. O resultado é plausível com as funções biológicas dos REs e, se há diminuição de RE α na presença do alelo A, os efeitos proliferativos deste também estariam diminuídos evitando a progressão tumoral. Já em relação ao genótipo GA no gene *ESR2* (c.1730G>A), o alelo G manteria as funções supressoras tumorais do gene exercendo a mesma proteção encontrada no alelo A do c.2014G>A. No entanto, com a evolução da doença e acúmulo de danos ao DNA,¹ esse efeito protetor não se manteria.

Durante a gestação ocorre proliferação celular na glândula mamária e após o parto, durante o período de amamentação, a mama passa por involução que envolve: afluxo de células do sistema imunológico, ativação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular. Esse processo resulta em um ambiente de cicatrização tumorigênica que precisa ocorrer de forma ordenada e lenta, por isso a importância da amamentação na prevenção do CM.^{94,95} Estudos revelam que a lactação diminui os efeitos da inflamação do tecido associada à involução pós-parto e protegeria as mulheres do desenvolvimento de tumores RE e RP negativos.^{96,97,98} Considerando que RE α e RE β estão expressos durante o período, podemos inferir que a diminuição na expressão de RE β poderia contribuir para a involução desordenada e predispor o aparecimento de neoplasias. Dessa forma, nossos resultados estariam de acordo com a hipótese visto que o genótipo GA (c.1730G>A) foi mais prevalente no grupo de pacientes que amamentaram, representando fator de risco para o CM nessa condição.

A HAS é uma comorbidade presente em 57,7% da amostra e foi verificado que o genótipo GA foi menos prevalente nos pacientes nessa condição. Os REs estão expressos no endotélio e musculatura lisa do tecido vascular³¹ e estimulam a produção de óxido nítrico que medeia a vasodilatação. Além disso, regulam a expressão de proteínas

vasodilatadoras e vasoconstrictoras incluindo componentes do sistema renina-angiotensina.⁹⁹⁻¹⁰¹ Ogawa et al. (2000)¹⁰² foram os primeiros a associar polimorfismos no gene *ESR2* com pressão arterial, detectando associação positiva com um polimorfismo de repetição CA. Recentemente, Chen et al. (2010)¹⁰³ detectaram aumento no risco de HAS para o genótipo GA no SNP c.1082G>A no gene *ESR2*, mas não para o c.1730G>A. Não foram encontrados na literatura mais estudos que elucidassem a influência do SNP c.1730G>A na regulação da pressão arterial.

Considerando as demais variáveis clínicas relacionadas ao CM, não foram vistos resultados semelhantes na literatura. O SNP c.2014G>A foi associado ao risco para o desenvolvimento de metástases em linfonodos regionais (N) no Irã ao considerar haplótipos no gene *ESR1*,^{43,44} e o genótipo GA aumentou o risco para metástases à distância na Romênia, quando considerada a heterozigose para o c.1029T>C (localizado também no gene *ESR1*).³⁹ Entretanto, Hsiao et al. (2004)⁴⁴ detectaram que o alelo A (c.2014G>A) diminuiria o risco para N, quando associado ao polimorfismo no códon 325, em estudo realizado em Taiwan.

Khalel et al. (2009)³⁸ encontraram associação positiva entre a expressão de HER2 e o SNP c.2014G>A em pacientes da Tunísia. Enquanto em população no norte da Índia foi evidenciado o aumento no risco para o desenvolvimento de CM em mulheres na menopausa e diabéticas na presença do polimorfismo.

Já para os polimorfismos no gene *ESR2* foram encontrados poucos estudos na literatura^{47,78,83} e apenas um encontrou resultado positivo para a associação entre o c.1730G>A e as variáveis clínicas. Borgquist et al. (2013)⁸³, em estudo realizado na Suécia, relataram menor sobrevida livre de doença na presença do alelo A e que o impacto dos genótipos seria dependente do IMC da paciente.

Finalmente, foi avaliada a combinação entre os polimorfismos nos REs (c.2014G>A e c.1730G>A) considerando os seguintes agrupamentos: GG/GG, homozigotos com expressão normal para ambos SNPs; GG/AA, com redução da expressão do *ESR2* e expressão normal do *ESR1* ocasionando maior efeito proliferativo; AA/GG, com redução da expressão do *ESR1* e expressão normal do *ESR2* ocasionando maior efeito antitumoral.^{41,42,46} Apesar de não ter sido observada modificação no risco de CM, a

comparação entre os grupos foi positiva apenas para o GG/GG *versus* as demais combinações de genótipos e a porcentagem RP no tecido tumoral ($p=0,023$), além de ter sido menos frequente nas pacientes que amamentaram ($p=0,027$). Visto que a expressão dos receptores hormonais RE e RP no tecido tumoral estão intimamente correlacionadas e sendo raro o perfil RE+/RP-^{10,13,20} o mais provável é que essa associação seja efeito da expressão de RE. E a menor prevalência do agrupamento nas pacientes que amamentaram pode confirmar a hipótese anteriormente proposta para o genótipo GA (c.2014G>A) que esteve mais prevalente nesse grupo.

6.4. Polimorfismos no gene *MTHFR* *versus* variáveis clínicas

A enzima MTHFR regula a disponibilidade de folato que é essencial para a síntese de purinas e como doador de grupos metil para diversos processos celulares, como a metilação de ácidos nucleicos e proteínas.⁵³ A deficiência desta enzima causa desequilíbrio na síntese de precursores do DNA e, como consequência, pode ocorrer incorporação de uracila com posterior quebra cromossômica; além de outros danos à molécula.^{55,56} Os polimorfismos c.677C>T e c.1298A>C reduzem a atividade enzimática para até 30% e foram associados a diversos tipos de câncer, aneuploidias, defeitos do tubo neural, dentre outras doenças.⁵⁵

Apesar de não modificarem o risco para CM, os polimorfismos foram associados às variáveis clínicas. O c.677C>T foi positivo para a porcentagem de expressão do RE ($p=0,020$), presença de metástase à distância ($p=0,028$) e estadiamento do CM ($p=0,028$). Semelhante ao c.677C>T, o c.1298A>C também foi positivo para porcentagem de expressão do RE ($p=0,009$) e estadiamento (0,034).

O genótipo CC (c.677C>T) foi mais prevalente nos pacientes que desenvolveram metástases à distância, representando um risco para essa condição, e foi associado à menor expressão de RE no tecido tumoral. O genótipo AA foi menos frequente no estadio clínico 0, representando um fator de risco para estadios de maior gravidade. Ao contrário do c.677C>T, o homozigoto AA apresentou maior expressão do RE em relação

aos demais genótipos devido, provavelmente, à baixa frequência do genótipo CC (12/253) e coincidente diminuição na porcentagem de expressão de RE.

Os alelos C (c.677C>T) e A (c.1298A>C) são responsáveis por manter a atividade normal da enzima MTHFR e, assim, converter em níveis normais o 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metilhidrofolato, a depender da quantidade de folato ingerido na dieta e da atividade da enzima concorrente TYMS.⁵³ Caso ocorra aumento na ingestão de folato ou diminuição na atividade da enzima TYMS, haverá mais substrato para a MTHFR e, conseqüentemente maior disponibilidade de grupos metil. Esse mecanismo, somado às influências ambientais, pode causar o silenciamento de genes por metilação da região promotora perturbando a homeostase e predispondo à progressão tumoral.^{28,29,104}

Na casuística, os genótipos CC (c.677C>T) e AA (c.1298A>C) predisõem à gravidade clínica provavelmente devido ao silenciamento de genes supressores tumorais pela metilação de ilhas CpGs. Pesquisas recentes revelaram metilação em genes, como *BRCA1*¹⁰⁴, *RASSF1A* (i. e. *Ras Association Domain Family Member 1 Gene*)¹⁰⁵, *CDH1* (i. e. *Cadherin 1 Gene*)¹⁰⁶ e *APC* (i. e. *Adenomatous Polyposis Coli Gene*)¹⁰⁷ na etiologia do CM sem avaliar a presença desses polimorfismos.

Cheng et al. (2012)¹⁰⁸ encontraram hipometilação do gene *IGF-2*, normalmente com quatro ilhas CpGs metiladas, associada aos genótipos TT e CT no polimorfismo c.677C>T e, inclusive a ausência de metilação foi associada com metástase em linfonodos regionais em câncer de bexiga. De Arruda et al. (2013)¹⁰⁹ detectaram relação positiva entre o genótipo CC (c.677C>T) e a metilação global do genoma em células da mucosa oral em indivíduos saudáveis. Tais resultados corroboram com a hipótese proposta.

A diminuição na expressão de RE no tecido tumoral associada ao genótipo GG pode ser devido à metilação. Aproximadamente, 27% dos tumores triplo-negativos apresentaram hipermetilação no gene *ESR1*.¹¹⁰

Em pesquisa realizada por Babyshkina et al. (2013)¹¹¹ envolvendo 300 pacientes na Rússia, o genótipo CT (c.677C>T) foi associado a tumores de tamanho inferior a 5 cm e a RE negativo no tecido tumoral. O alelo T foi mais frequente nos tumores RE positivos e o genótipo TT foi relacionado à melhor sobrevivência entre as mulheres na pré-menopausa.

Finalmente, foi avaliada a relação entre CM e a combinação dos polimorfismos no gene *MTHFR* (c.677C>T e c.1298A>C) considerando os seguintes haplótipos: CC/AA, com atividade normal da enzima; TT/AA e CT/AC, com atividade reduzida da enzima. A comparação foi positiva para: CC/AA *versus* os demais haplótipos (com pelo menos uma variante rara) e o uso de contraceptivo hormonal (p=0,013), HAS (p=0,043) e estadiamento da doença (p=0,024); CT/AC *versus* os demais haplótipos e o tipo histológico do tumor (p=0,032), e estadiamento da doença (p=0,044). Em relação ao estadiamento, o resultado foi semelhante ao observado na análise individual dos polimorfismos: o haplótipo CC/AA teve maior prevalência no estadio II, ou seja, foi associado com relativa gravidade do CM; enquanto o haplótipo CT/AC foi mais prevalente no estadio 0 em relação aos de maior gravidade, conferindo proteção para a progressão tumoral.

O uso de contraceptivos hormonais por longo período durante a vida reprodutiva representa fator de risco para o desenvolvimento de CM esporádico, devido ao estímulo proliferativo exercido pelo estrógeno exógeno na glândula mamária.³⁷ O haplótipo CC/AA possui 3,6 vezes maiores chances de estar associado ao uso de contraceptivos hormonais e, juntos, podem aumentar o risco para o desenvolvimento de CM.

O haplótipo CC/AA foi associado à presença de HAS, sendo mais prevalente no grupo de pacientes que apresentavam a condição. No entanto, os genótipos que conferem diminuição da enzima *MTHFR* têm sido associados ao aumento no risco para HAS arterial.^{112,113} A diminuição da atividade da enzima *MTHFR* ocasiona o aumento nos níveis de homocisteína, devido a redução na metilação da mesma em metionina, que induz a constrição arterial, aumento na reabsorção de sódio e disfunção renal.¹¹³ Apesar do resultado encontrado, o mais provável é que a HAS nos pacientes não tenha sido influenciada pelos polimorfismos no gene *MTHFR*.

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que os polimorfismos c.2014G>A no gene *ESR1*, c.1730G>A no gene *ESR2*, c.677C>T e c.1298A>C no gene *MTHFR* parecem não modificar diretamente o risco para CM, mas podem ser indicados como preditores de gravidade da doença.

A princípio, são necessários mais estudos visto que algumas das associações encontradas não foram descritas por outros autores e precisam ser confirmadas em um maior número de sujeitos, preferencialmente, com características clínicas semelhantes para melhor apuração dos dados.

8. REFERÊNCIAS

1. Koutsogiannouli E, Papavassiliou AG, Papanikolaou NA. Complexity in cancer biology: is systems biology the answer?. *Cancer Med.* 2013;2(2):164-77.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistic. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from <http://globocan.iarc.fr>. (Acesso em 05/2014).
4. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
5. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:1893-907.
6. Freitas-Junior R, Gonzaga CMR, Freitas NMA, Martins E, Dardes RCM. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. *Clinics.* 2012;7(5):731-7.
7. Ginsburg OM, Love RR. Breast Cancer: a neglected disease of the majority of affected women worldwide. *Breast J.* 2011;17(3):289-95.
8. Abdulkareem IH. Aetio-pathogenesis of breast cancer. *Niger Med J.* 2013;54(6):371-5.
9. Ellis IO, Schmitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V et al. WHO Classification of Tumours of the Breast, 3th ed. Lyon, IARC Press, 2003.
10. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast Cancer. *J Pathol.* 2005;205:248-54.
11. Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO Classification of Breast Cancer Tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care.* 2013;8(2):149-54.
12. Reis-Filho JS, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother?. *J Pathol.* 2008;216:394-8.

13. Eroles P, Bosh A, Peres-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(6):698-707.
14. Strehl JD, Watcher DL, Fasching PA, Beckmann MW, Hartmann A. Invasive breast cancer: recognition of molecular subtypes. *Breast Care.* 2011;6(4):258-64.
15. Caldarella A, Buzzoni C, Crocetti E, Bianchi S; Vezzoni V, Apicella P et al. Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(4):617-23.
16. Singletary E, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on cancer staging system of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(17):3628-36.
17. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.
18. Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology.* 2008;75(2):104-11.
19. Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-12.
20. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van der Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular Portraits of human breast tumors. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
21. Gluz O, Hofmann D, Wurstlein R, Liedke C, Nitz U, Harbeck N. Genomic profiling in luminal breast cancer. *Breast Care.* 2013;8(6):414-22.
22. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Smith LU et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109(1):123-39.
23. Liedke C, Bernemann C, Kiesel L, Rody A. Genomic profiling in triple-negative breast cancer. *Breast Care.* 2013;8(6):408-13.
24. Vineis P, PWild C. Global cancer patterns: causes and preventions. *Lancet.* 2014;383(9916):549-57.
25. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72(5):1117-30.

26. Antoniou AC, Chenevix-Trench G. Common genetics variants and cancer risk in mendelian cancer syndromes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2010;20:299-307.
27. Milne RL, Antoniou AC. Genetics modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutations carriers. *Ann Oncol*. 2011;22(Suppl 1):i11-7.
28. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(7):687-692.
29. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-1159.
30. Dobrovic A, Kristensen LS. DNA methylation, epimutations and cancer predisposition. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;41(1):34-9.
31. Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological role of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res*. 2012;28(2):71-6.
32. Dowsett M, Daffada A, Chan CMW, Johnston SRD. Oestrogen receptor mutants and variants in breast cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33(8):1177-83.
33. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G et al. Human Estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression patterns. *Journal of Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):4258-65.
34. Kong EH, Pike ACW, Hubbard RE. Structure and mechanism of the oestrogen receptor. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(part1):56-9.
35. Nelson ER, Habibi HR. Estrogen receptor function regulation in fish and other vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;192:15-24.
36. Zhou Z, Qiao JX, Shetty A, Wu G, Huang Y, Davidson NE, Wan Y. Regulation of estrogen receptor signaling in breast carcinogenesis and breast cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2013;71(8):1549.
37. Caldon CE. Estrogen signaling and the DNA damage response in hormone dependent breast cancers. *Front Oncol*. 2014;4:106.
38. Kallel I, Rebai M, Rebai A. Mutations and polymorphisms of estrogens receptors genes and diseases susceptibility. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012;32(6):304-13.

39. Anghel A, Narita D, Sedaman E, Popovici E, Anghel M, Tamas L. Estrogen receptor alpha polymorphisms and the risk of malignancies. *Pathol Oncol Res.* 2010;16:485-96.
40. Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Douglas D, Coutts A, Watson PH. Estrogen receptors variants and mutations. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1997;62(6):363-72.
41. Plotkin JB, Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet.* 2011;12(1):32-42.
42. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV et al. A “silent” polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science.* 2007;315(5811):525-8.
43. Abbasi S, Nouri M, Azimi C. Estrogen receptor gene variations and breast cancer risk in Iran. *Int J Clin Exp Med.* 2012;5(4):332-41.
44. Hsiao WC, Young KC, Lin SL, Lin PW. Estrogen receptor- α polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 2004;6(3):180-6.
45. Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H et al. Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4524-7.
46. Putnik M, Zhao C, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Effects of two common polymorphisms in the 3'-untranslated regions of estrogen receptor β on mRNA stability and translability. *BMC Genet.* 2009;10:55.
47. Cox DG, Bretsky P, Kraft P, Pharoah P, Albanes D, Altshuler D et al. Haplotypes of the estrogen receptor beta gene and breast cancer gene risk. *Int J Cancer.* 2008;122(2):387-92.
48. Kallel I, Rebai M, Rebai A. Mutations and polymorphisms of estrogens receptors genes and diseases susceptibility. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012;32(6):304-13.
49. Abbas S, Beckmann L, Chang-Claude J, Hein R, Kropp S, Parthimos M et al. Polymorphisms in genes of the steroid receptor superfamily modify postmenopausal breast cancer risk associated with menopause hormone therapy. *Int J Cancer.* 2009;126:2935-46.
50. Iwasaki M, Hamada GS, Nishimoto IN, Netto MM, Motola-Jr J, Larginha FM et al. Isoflavone, polymorphism in estrogen receptor gene and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Sci.* 2009;100(5):927-33.

51. Goyette P, Samner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics*. 1994;7:195-200.
52. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LAJ, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000;257(2):279-89.
53. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull*. 1999;55(3):578-92.
54. Zu B, Xiahou Z, Zhao H, Peng B, Zhao H, Xu X. MTHFR promotes heterochromatin maintenance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;447(4):702-6.
55. Lievers KJA, Boers GHJ, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, Van der Put NMJ et al. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med*. 2001;79(9):522-8.
56. Kim JW, Park HM, Choi YK, Chong SY, Oh D, Kim NK. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and plasma DNA methylation in colorectal cancer patients. *Oncol Rep*. 2011;25(1):167-72.
57. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10(1):111-3.
58. Van der Put NMJ, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1044-51.
59. Izmirli M. A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphism) and cancer risk. *Mol Biol Rep*. 2013;40(1):625-37.
60. Platek ME, Shields PG, Marian C, McCann SE, Bonner MR, Nie J et al. Alcohol consumption and genetic variation in MTHFR and MTR in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(9):2453-59.
61. Diakite B, Tazzite A, Hamzi K, Jouhadi H, Nadifi S. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and breast cancer risk in Moroccan women. *Afri Health Sci*. 2012;12(2):204-9.
62. Hosseini, M, Houshmand M, Ebrahimi A. MTHFR polymorphisms and breast cancer risk. *Arch Med Sci*. 2011;7(1):134-7.

63. Martin DN, Boersma B, Howe TM, Goodman JE, Mechanic LE, Chanock SJ et al. Association of MTHFR gene polymorphisms with breast cancer survival. *BMC Cancer*. 2006;6(257):1-6.
64. Ma E, Iwasaki M, Junko I, Hamada GS, Nishimoto IN, Carvalho SMT et al. Dietary intake of folate, vitamin B₆, and vitamin B₁₂, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer*. 2009;9:122.
65. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C→T and 1298 A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet*. 2004;41(6): 454-8.
66. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):195-201.
67. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042-54.
68. Hackett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1609):20110328.
69. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res*. 2001;475(1-2):7-20.
70. Woodhead NE, Long WF, Williamson FB. Binding of zinc ions to heparin. Analysis by equilibrium dialysis suggests the occurrence of two, entropy-driven, processes. *Biochem J*. 1986; 237:281-4.
71. Sobti RC, Askari M, Nikbakht M, Singh N, Sharma SC, Abitew AM. Genetics variants of EGFR (142285 G>A) and ESR1 (2014 G>A) gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Mol Cell Biochem*. 2012;369(2):217-25.
72. Wang Z, Yoshida S, Negoro K, Kennedy S, Barlow D, Maruo T. Polymorphism in the estrogen receptor beta gene but not estrogen receptor alpha gene affect the risk of developing endometriosis in a Japanese population. *Fertil Steril*. 2004;81(6):1650-6.
73. Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A.-G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41, 1149-1160.
74. Santiago R, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiology*. 2009.

75. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão. www.OpenEpi.com, atualizado 22 set 2014.
76. Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH: Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 2003;19(3):376–382
77. Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, White BC: A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol* 2006; 241(2):252-61.
78. Maguire P, Margolin S, Skoglund J, Sun XF, Gustafsson JA, Borresen-Dale AL et al. Estrogen receptor beta (*ESR2*) polymorphism in familial and sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;94(2):145-52.
79. Ericson UC, Ivarsson MI, Sonestedt E, Gullberg B, Carlson J, Olsson H et al. Increased breast cancer risk at high plasma folate concentrations among women with the MTHFR 677T allele. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(5):1380-9.
80. Barbosa RCC, da Costa DM, Cordeiro DE, Vieira AP, Rabenhorst SH. Interaction of *MTHFR* C677T and A1298C, and *MTR* A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in Northeast Brazil. *Anticancer Res.* 2012;32(11):4805-11.
81. Lu Q, Jiang K, Li Q, Ji YJ, Chen WL, Xue XH. Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer risk and prognosis in a Chinese Population. *Tumour Biol.* 2015.
82. Jiménez IJ, Cardeñosa EE, Suela SP, González EB, Carretero IA, Gandía BM et al. Low prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in the sporadic breast cancer of Spanish population. 2011;11:49-56.
83. Borgquist S, Hjertberg M, Henningson M, Ingvar C, Rose C, Jernstrom H. Given breast cancer is a fat better than thin? Impact of the estrogen receptor beta gene polymorphism. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137:849-62.
84. Kabat GC, Xue X, Kamensky V, Lane D, Bea JW, Chen C et al. Risk of breast cancer, endometrial, colorectal, and renal cancers in postmenopausal women in association with a body shape index and other anthropometric measures. *Cancer Causes Control.* 2015;26(2):219-29.
85. Heo M, Kabat GC, Strickler HD, Lin J, Hou L, Stefanick ML et al. Optimal cutoffs of obesity measures in relation to cancer risk in postmenopausal women in the Women's Healthy Initiative Study. *J Womens Health (Larchmt).* 2015;24(2).

86. Cleary MP, Grossmann ME, Ray A. Effect of obesity on breast cancer development. *Vet Pathol.* 2010;47(2):202-13.
87. Akisik E, Dalay N. Estrogen receptor codon 594 and HER2 codon 655 polymorphisms and breast cancer gene risk. *Exp Mol Pathol.* 2004;76(3):260-3.
88. Batschauer AP, Cruz NG, Oliveira VC, Coelho FF, Santos IR, Alves MT et al. *HFE*, *MTHFR*, and *FGFR4* genes polymorphisms and breast cancer in Brazilian women. *Mol Cell Biochem.* 2011;357:247-53.
89. Bravata V. Controversial roles of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and folate in breast cancer disease. *Int J Nutr.* 2015;66(1):43-9.
90. Tsai CW, Hsu CF, Tsai MH, Tsou YA, Hua CH, Chang WS et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) genotype, smoking habit, metastasis and oral cancer in Taiwan. *Anticancer Res.* 2011;31(6):2395-2400.
91. Shrubsole MJ, Gao YT, Cai Q, Shu XO, Dai Q, Hérbet JR et al. *MTHFR* polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(2):190-6.
92. Bailey LB. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the *MTHFR* 677C→T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. *J Nutr.* 2003;133(Suppl1):3748S-53S.
93. Gustafsson J, Warner M. Estrogen Receptor β in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74(5):245-8.
94. Clarkson RW, Wayland MT, Lee J, Freeman T, Watson CJ. Gene expression. Profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Res.* 2004;6(2):R92-109.
95. Watson CJ. Post-lactational mammary gland regression: molecular basis and implications for breast cancer. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8(32):1-15.
96. Palmer JR, Viscidi E, Troester MA, Hong C, Schedin P, Bethea TN et al. Parity, lactation, and breast cancer subtypes in African women. 2014.pii:dju237.
97. Work ME, John EM, Andrulis IL, Knight JA, Liao Y, Mulligan AM et al. Reproductive risk factors and oestrogen/progesterone receptor-negative breast cancer in the Breast Cancer Family Registry. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1367-77.

98. Ambrosone CB, Zirpoli G, Ruszczk M, Shankar J, Hong C, McIlwain D et al. Parity and breastfeeding among African-American women. *Cancer Control*. 2014;25(2):259-265.
99. Karas RH, Patterson BL, Mendelshon ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation*. 1994;89(5):1943-50.
100. Mendelsohn ME, Karar RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801-11.
101. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(11):5212-6.
102. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor β (ESR2) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet*. 2000;45:327-30.
103. Chen C, Li Y, Chen F, Pan H, Shen H, Sun Z et al. Estrogen receptor beta genetic variants and combined oral contraceptive use as relates to the risk of hypertension in Chinese women. *Arch Med Res*. 2010;41(8):599-605.
104. Xu X, Gammon MD, Zhang Y, Bestor TH, Zeisel SH, Wetmur JG et al. *BRCA1* promoter methylation with associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;145(2):397-404.
105. Hagrass HA, Pasha HF, Shaheen MA, Bary EHA, Kassem R. Methylation status and protein expression of *RASSF1A* in breast cancer patients. *Mol Biol Rep*. 2014;41:57-65.
106. Kioufala M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Kallikrein 10 (*KLK10*) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(6):1020-5.
107. Coyle YM, Xie XJ, Lewis CM, Bu D, Milchgrub S, Euhus DM. Role of physical activity in modulating breast cancer risk as defined by *APC* and *RASSF1A* promoter hypermethylation in nonmalignant breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(2):192-6.
108. Cheng H, Deng Z, Wang Z, Zhang W, Su J. *MTHFR* polymorphism are associated with aberrant methylation of the IGF-E gene in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Biomed Res*. 2012;26(2):77-83.
109. De Arruda IT, Persuhn DC, de Oliveira NF. The *MTHFR* polymorphism and global DNA methylation in oral epithelial cells. *Genet Mol Biol*. 2013;36(4):490-3.

110. Prabhu JS, Wahi K, Kormaria A, Correa M, Manjunath S, Raman N et al. The epigenetic of the estrogen receptor (ER) by hypermethylation of the ESR1 promoter is seen predominately in triple-negative breast cancer in Indian women. *Tumour Biol.* 2012;33(2):315-23.
111. Babyshkina N, Malinovskaya E, Nazarenko M, Koval M, Gervas P, Potapova O et al. The effect of folate-related SNPs on clinicopathological features, response to neoadjuvant treatment and survival in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *Gene.* 2013;518:397-404.
112. Markan S, Sachdeva M, Sehrawat BS, Kumari S, Jain S, Khullar M. *MTHFR* 677CT/*MTHFR*1298CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Mol Cell Biochem.* 2007;302(1-2):125-31.
113. Wu Y, Hu C, Lu S, Cong F, Feng F, Qian Z et al. Association between methyletetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T/A1298C polymorphisms and essential hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 2014;63(12):1503-11.

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: METILAÇÃO NO PROMOTOR DO GENE BRCA1 E POLIMORFISMOS NOS GENES ESR1, ESR2, PGR E MTHFR COMO FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO

Pesquisador: Luciana Montes Rezende

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 09124812.4.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 185.106

Data da Relatoria: 22/01/2013

Apresentação do Projeto:

Serão utilizadas 230 amostras de sangue de portadoras de Câncer Mama, armazenadas sob o consentimento dos pacientes, no Biorrepositório do Laboratório de Genética Molecular do Câncer e 455 amostras com 7 ml de sangue de mulheres sem doença e histórico de câncer familiar recrutadas na população (há um cartaz elaborado para esse fim). Esse material será submetido a procedimentos laboratoriais para estudo genético. As amostras de DNA dos sujeitos e controles serão submetidas à técnica de RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction). A análise estatística será realizada pelo software SPSS vs17.0. De acordo com a distribuição dos dados, o teste Chi quadrado será empregado com o intuito de averiguar a distribuição dos polimorfismos entre a população com CM e controle. Segundo a diferença no percentual de cada polimorfismo, em seus diferentes genótipos, será calculado o Odds Ratio. Serão selecionados um total de 685 sujeitos para a pesquisa, tendo como objetivo um poder amostral de 95%, com erro alfa de 0.05 e menor frequência alélica do polimorfismo 2014A de 0.17. Além da análise de associação dos polimorfismos, será realizada a interação gênica entre os polimorfismos pelos softwares Multifactor Dimensionality Reduction (MDR), o qual é um modelo não paramétrico e de interação não linear entre fatores genéticos e ambientais (50,51). Para ajustar as múltiplas comparações, será realizado o teste MDR permutation test na amostra, totalizando 100.00 permutações.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a associação entre CM esporádico, mecanismos epigenéticos de silenciamento no gene BRCA1 e polimorfismos em genes que codificam os receptores de estrógeno (ESR1 e ESR2), progesterona (PGR) e em gene responsável pelo metabolismo do folato (MTHFR). Detectar a presença de metilação na região promotora do gene BRCA1 em pacientes diagnosticados com CM esporádico. Verificar a frequência dos polimorfismos: G2014A no gene ESR1, C1176G no gene ESR2, G660C no gene PGR, C677T e A1298C no gene MTHFR nestes pacientes. Associar a presença de metilação e os polimorfismos nos genes especificados com a ocorrência de CM esporádico, verificando a possibilidade de serem utilizados como marcadores de risco para a doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora os riscos relacionados a este trabalho são mínimos e diz respeito à coleta de sangue venoso dos participantes do grupo controle. Será coletada uma amostra de sangue venoso (7 ml), podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento. Benefícios: Os resultados obtidos irão contribuir para o entendimento de algumas vias genéticas no desenvolvimento do câncer de mama. Poderão contribuir para a construção de parâmetros prognósticos que possam prever a evolução clínica dos pacientes e direcioná-los para a melhor estratégia terapêutica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante porque traz a proposta de utilizar a genética para detectar precocemente o desenvolvimento de câncer de mama, trata-se de uma tecnologia que poderá ser útil para otimizar o tratamento e melhorar o prognóstico das pessoas vulneráveis. O estudo utilizará amostras previamente armazenadas e novas amostras que comporão o grupo controle.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

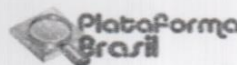
Folha de rosto com assinatura da pesquisadora principal e do representante da proponente (HC/Unicamp). Foram apresentados cronograma e orçamento adequados ao estudo. Por se tratar de projeto na área de genética humana com utilização de material armazenado, adequações foram realizadas em consideração às resoluções 340/04 e 441/2011, incluindo o envio do regulamento do biorrepositório.

Recomendações:

1. Lembremos que o TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador (resolução 196/96 CNS/MS, artigo IV.2 "d").
2. Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado após respostas às pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 14 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- Grupo Controle

METILAÇÃO NO PROMOTOR DO GENE *BRCA1* E POLIMORFISMOS NOS GENES *ESR1*, *ESR2*, *PGR* E *MTHFR* COMO FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO

Eu entendo que fui convidado a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com e sem câncer de mama (CM). O objetivo geral desse trabalho será estudar a metilação no gene *BRCA1* e os polimorfismos nos genes *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *MTHFR* em pacientes diagnosticados com CM esporádico e sem este diagnóstico (grupo controle), com o objetivo de saber se existe maior ou menor de risco de se ter a doença na presença ou ausência da metilação e alguns polimorfismos.

Você fará parte do Grupo Controle.

Se concordar em participar desse estudo, será coletada uma amostra de sangue venoso (7 ml, o equivalente a meia colher de sopa). Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

A única vantagem que poderei ter é saber se há alguma alteração nos genes em estudo. Não se sabe se essas alterações estão associadas ao câncer de mama, mas de qualquer maneira, se eu quiser, poderei receber o resultado do teste e no final do estudo, estará disponível para mim o aconselhamento genético a ser realizado pela geneticista Carmen Sílvia Bertuzzo, no ambulatório de Oncogenética do HC/Unicamp. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 3521-8902 (Luciana Montes Rezende).

() quero receber meu resultado de exame

() não quero receber meu resultado de exame

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão sigilosos. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado. Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado e que qualquer outro projeto que pretenda utilizá-lo, deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM. Eu estou ciente que a minha participação neste projeto de pesquisa não me acarretará nenhuma despesa, já que a coleta de material será realizada em minhas consultas regulares à Unicamp.

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que minha família recebe atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Em caso de recurso ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp, tel. (019) 3521-8936. *Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (FCM-Unicamp), parecer nº 185.106.

Eu confirmo que a pós-graduanda Luciana Montes Rezende, explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconfortos advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento, recebi uma via e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG do sujeito da pesquisa

Nome e RG do responsável legal

Assinatura do sujeito da pesquisa

Data

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Luciana Montes Rezende RG: MG-15.659.552

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data”