

LIDIANE CAMILA RUEDA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CYP1A1,
CYP2D6 E CYP19 EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

LIDIANE CAMILA RUEDA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CYP1A1,
CYP2D6 E CYP19 EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS ALBERTO MAGNA

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R836a Rueda, Lidianne Camila
Avaliação de polimorfismos nos genes CYP1A1, CYP2D6 e
CYP19 em uma amostra de pacientes com câncer de mama esporádico
/ Lidianne Camila Rueda. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Carmen Sílvia Bertuzzo, Luís Roberto Magna
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mamas - cancer. 2. Citocromo P- 450. I. Bertuzzo, Carmen
Sílvia. II. Magna, Luís Roberto. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Evaluation of polymorphism in the genes CYP1A1,
CYP2D6 and CYP19 in patients with cancer of sporadic breast**

Keywords: • Breast – neoplasm
• Cytochrome P-450 Enzyme System

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
Profa. Dra. Ester Silveira Ramos**

Data da defesa: 25 - 01 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "C. Bertuzzo", is written over the name.

Membros:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "C. Bertuzzo", is written over the name.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "C. Steiner", is written over the name.

Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "Ester S. Ramos", is written over the name.

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

Data: 25/01/2008

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu pai Antonio Carlos Rueda
que foi um exemplo em vida, deixou alegria,
paz e muito amor nos corações das pessoas que o conheceram.
Que me apoiou e me incentivou desde pequena para seguir adiante.
Mesmo estando longe, sempre em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus* que me deu capacidade e força.

À *Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo* pela oportunidade valiosa de trilhar o caminho da ciência, pela orientação conferida, além da amizade e apoio.

À *Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo* e ao *Prof. Dr. Edson Antunes* por fazerem parte da banca de qualificação. Ao *Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner* e à *Profa. Dra. Ester Silveira Ramos* por participarem da minha banca de defesa. À *Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes* e ao *Prof. Dr. Valter Pinto Júnior*. Obrigada por aceitarem analisar e avaliar este trabalho. Minha grande admiração e sincera amizade.

A todo pessoal do laboratório de Genética Molecular pela convivência.

Aos meus amigos do laboratório por me acolherem, pelo carinho, amizade e ajuda de sempre: *Luciana Bonadia, Cyntia Arivabeni, Rodrigo Secolin, Daniela Furgeri, Estela Gonçalves, Renato, Fabio Rossi, Cláudia Morelli, Elisângela, Isabel, Marilza, Daniel Zanetti, Társis, Aline, Simone, Romênia e Lucila*.

À Universidade Estadual de Campinas, e aos professores dos departamentos de Farmacologia e de Genética Médica por todo conhecimento transmitido.

Ao secretário da Farmacologia *Wanderlei* pelo auxílio de sempre.

Aos pacientes e indivíduos controles que constituíram os dados da pesquisa e tornaram possível esta investigação.

Aos amigos do Hemocentro e a amiga *Karina Antero Rosa*.

Ao *CNPq* e a *Fapesp* pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Em especial...

Ao *Evguen* meu querido, pelo enorme apoio e ajuda durante estes anos. Pelo carinho, companheirismo e amor.

À minha mãe *Maria de Lourdes* e sogra *Eliane* pela torcida de que tudo daria certo.

À minha irmã *Luciana*, cunhado *Edson* e ao querido(a) *sobrinho(a)* que está a caminho.

Às minhas famílias *Rueda* e *Paschoaletto* pelo carinho.

Aos amigos da IPIL pelo apoio.

	PÁG.
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Câncer de mama	21
1.1.1- Suscetibilidade genética ao câncer de mama.....	25
1.2- Biotransformação de xenobióticos	26
1.2.1- Citocromo P450 (CYPs).....	29
1.2.1.1- Gene CYP1A1.....	30
1.2.1.2- Gene CYP2D6.....	31
1.2.1.3- Gene CYP19.....	33
2- OBJETIVOS	34
2.1- Objetivo geral	35
2.2- Objetivos específicos	35
3- METODOLOGIA	36
3.1- Casuística	37
3.1.1- Critérios de inclusão dos casos.....	37
3.1.2- Critérios de exclusão dos casos.....	37
3.1.3- Critérios de inclusão para indivíduos do grupo controle.....	38
3.2- Métodos	38
3.2.1- Extração de DNA.....	38
3.2.2- Análises dos polimorfismos.....	39

• Polimorfismo m1 do gene CYP1A1.....	39
• Polimorfismo m2 do gene CYP1A1.....	41
• Polimorfismo *3 do gene CYP2D6.....	44
• Polimorfismo *4 do gene CYP2D6.....	46
• [TTTA] _n do gene CYP19.....	48
3.3- Análise estatística.....	49
4- RESULTADOS.....	50
5- DISCUSSÃO.....	54
6- CONCLUSÕES.....	59
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8- ANEXOS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

*3 ou A2637del	Polimorfismo do gene CYP2D6
*4 ou G1934A	Polimorfismo do gene CYP2D6
Ah	Aril-hidrocarboneto
AHH	Aril-hidrocarboneto-hidroxilase
aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CM	Câncer de mama
CYP1A1	Gene do sistema de citocromo P450
CYPs	Genes da família do citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeo tri fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Metabolizadores extensivos
IEM	metabolizadores extensivos intermediários
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
m1 ou T6235C	Polimorfismo do gene CYP1A1
M1-AS	iniciador reverso
M1-S	iniciador direto
m2 ou A4889G	Polimorfismo do gene CYP1A1
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	metabolizadores pobres

r.p.m	Rotação por minuto
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq	Termus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris – tris	(hidroximetil)-aminoetano
TTTA _n	Polimorfismo do gene CYP19

LISTA DE TABELAS

		PÁG.
Tabela 1-	Seqüência dos iniciadores utilizados para amplificação gênica...	39
Tabela 2-	Comparação das atividades metabólicas previstas a partir dos genótipos entre casos e controles dos polimorfismos *3 e *4.....	53
Tabela 3-	Distribuição genotípica dos alelos do gene CYP19 entre os casos de CM e controles.....	53

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo m1	41
Figura 2- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo m2	43
Figura 3- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo *3	45
Figura 4- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo *4	47
Figura 5- Genotipagem do CYP19.....	49

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- Ordenação dos cinco principais tipos de câncer nas regiões brasileiras por 100 mil homens. Com exceção do câncer de pele não melanoma.....	20
Quadro 2- Ordenação dos cinco principais tipos de câncer nas regiões brasileiras por 100 mil mulheres. Com exceção do câncer de pele não melanoma.....	21
Quadro 3- Distribuição genotípica dos alelos m1 e m2 do gene CYP1A1 entre os casos de CM e controles.....	51
Quadro 4- Distribuição genotípica dos alelos *3 e *4 do gene CYP2D6 entre os casos de CM e controles.....	52

RESUMO

O câncer de mama (CM) é uma doença heterogênea e complexa, compreendendo múltiplas formas de apresentação clínica e morfológica, com diferentes graus de agressividade tumoral e potencial metastático. Acredita-se que 90% a 95% de todos os CM sejam esporádicos e decorram de mutações somáticas que se verificam durante a vida e que 5% a 10% sejam hereditários em virtude de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estes indivíduos suscetibilidade ao CM.

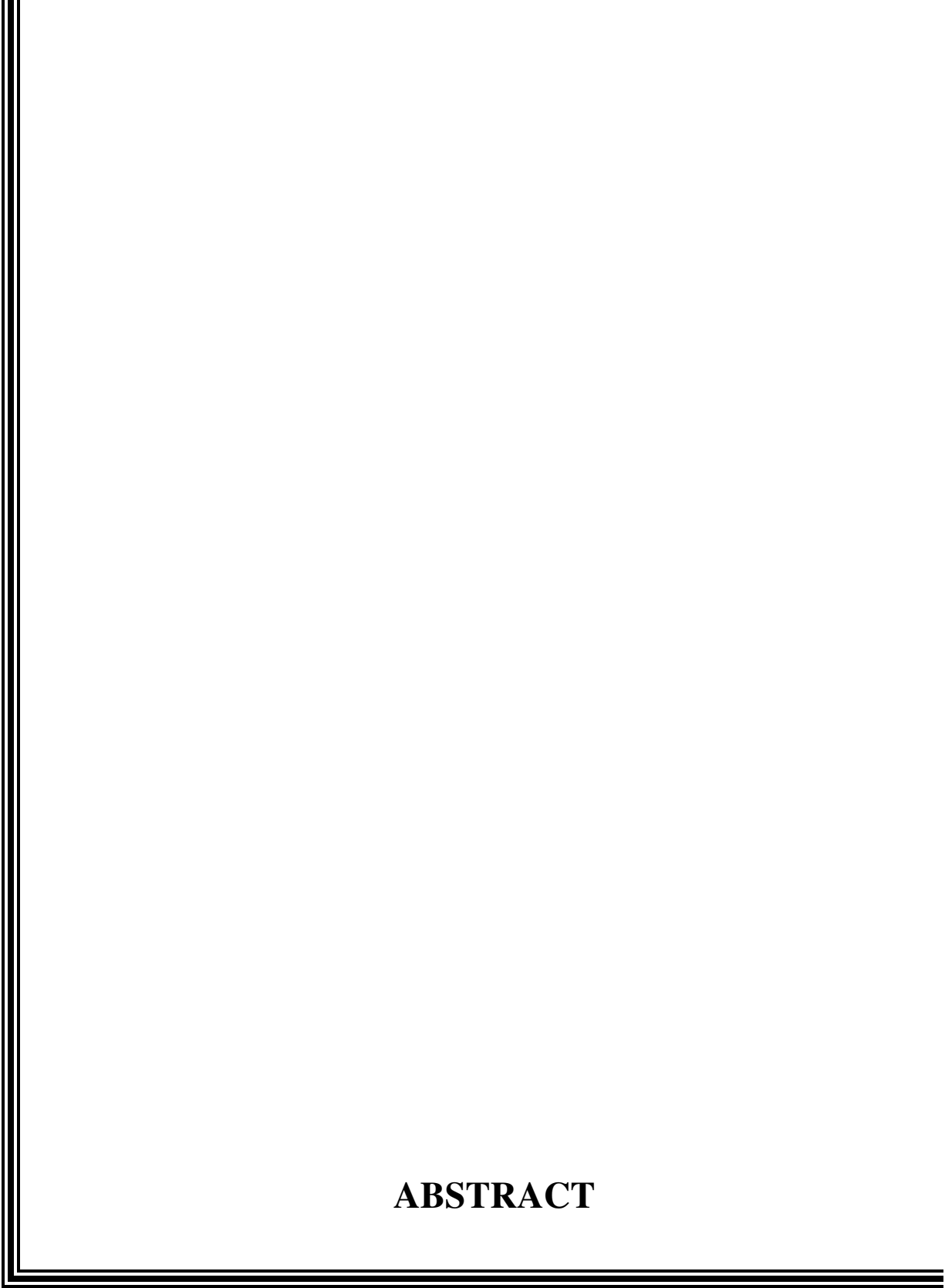
Entre os polimorfismos mais conhecidos de metabolização de drogas, estão os do sistema do citocromo P450. Os genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP19* estão sendo estudados e em algumas populações mostraram uma associação positiva com a maior suscetibilidade ao CM.

Este trabalho teve como objetivo investigar a presença dos polimorfismos T6235C (m1) e A4889G (m2) no gene *CYP1A1*, a presença dos polimorfismos A2637del (*3) e G1934A (*4) no gene *CYP2D6* e a presença de alterações [TTTA_n] no gene *CYP19*, por meio de um estudo de associação com uma amostra de 170 indivíduos, sendo 45 pacientes portadores de Adenocarcinoma e 120 controles normais. Foram utilizadas as técnicas extração de DNA, PCR e digestão enzimática.

Não foi demonstrada, no presente estudo, associação entre os polimorfismos estudados e CM esporádico: ($\chi^2_{(2)} = 1,12$; $p = 0,57$) para o polimorfismo m1, ($\chi^2_{(2)} = 0,83$; $p = 0,65$) para o polimorfismo m2 do gene *CYP1A1*; ($\chi^2_{(2)} = 0,15$; $p = 0,69$) para o polimorfismo *3, ($\chi^2_{(2)} = 2,41$; $p = 0,30$) para o polimorfismo *4 do gene *CYP2D6* e para as repetições em tandem [TTTA]_n do gene *CYP19*.

Os resultados sugerem que os polimorfismos gênicos estudados não estariam associados ao CM na amostra de indivíduos da região metropolitana de Campinas.

Palavras-chave: *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP19*, câncer de mama esporádico.



ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a complex disease, with heterogeneous clinical and morphologic presentation, that has with different degrees of tumoral aggressiveness and metastatic potential. It is known that 90% to 95% of all the BC are sporadic and happens because of somatic mutations that occurs during life and that 5% to 10% are hereditary because of germinate mutation due to births, which makes these individuals susceptible to the BC.

Among the best known polymorphism of metabolism of drugs, are the system cytochrome P450. The genes CYP1A1, CYP2D6 and CYP19 are being studied and in some populations because they had shown a positive association with the biggest susceptibility to the BC.

This work had as objective to investigate the presence of polymorphisms T6235C (m1) and A4889G (m2) in gene CYP1A1, polymorphisms A2637del (*3) and G1934A (*4) in gene CYP2D6 and the presence of alterations [TTTAn] in gene CYP19, through a study of association with a sample of 170 individuals: 45 carrying patients of adenocarcinoma and 120 normal controls.

The techniques had been used extraction of DNA, PCR and enzymatic digestion.

It was not demonstrated, in this study the association between the polymorphisms studied and sporadic BC ($\chi^2_{(2)} = 1,12; p = 0,57$) for the polymorphism m1, ($\chi^2_{(2)} = 0,83; p = 0,65$) for the polymorphism m2 of gene CYP1A1; ($\chi^2_{(2)} = 0,15; p = 0,69$) for polymorphism *3, ($\chi^2_{(2)} = 2,41; p = 0,30$) for polymorphism *4 of gene CYP2D6 and for gene CYP19.

The results suggest that the genic polymorphisms studied would not be associated with the BC in the sample of individuals in the metropolitan area of Campinas.

key words: CYP1A1, CYP2D6, CYP19, sporadic breast cancer.

1- INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética. O tumor maligno é caracterizado pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se por meio de metástase para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (Crum, 1996; Alberts, 1997; Lewis e Conry, 1997).

O comportamento anormal das células cancerosas é geralmente caracterizado por mutações genéticas, expressões de características oncológicas, secreção anormal de hormônios ou enzimas. Todos os cânceres têm potencial de invasão ou de metastatização, mas cada tipo específico possui características clínicas e biológicas que devem ser estudadas para um adequado diagnóstico, tratamento e acompanhamento (McPherson et al., 2000). Os tumores chamados benignos apresentam crescimento lento além de não possuírem capacidade de gerar metástases.

As estatísticas mostram que algumas formas de câncer atingem mais de um terço da população e contribuem com mais de 20% de todas as mortes, sendo a doença responsável por mais de 10% do custo total com cuidados médicos nos países desenvolvidos (Nussbaum et al., 2002).

No último ano, foram registrados 130 mil óbitos de câncer no Brasil. Um volume maior do que o número de casos de aids acumulados em 24 anos. Entre 1979 e 2003, a taxa de mortalidade pela doença cresceu 30% (INCA, 2007).

A estimativa 2008 de incidência do câncer no Brasil revela que aproximadamente 470 mil novos casos da doença deverão ocorrer no país em 2008 e 2009. Desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer com maior número de novos casos no sexo masculino serão os de próstata e pulmão, enquanto em mulheres a incidência será maior dos cânceres de mama e colo de útero. O perfil da doença é semelhante ao observado em outros países. Entre homens, estima-se que haverá 231.860 novos casos de câncer, sendo os tipos mais incidentes o câncer de pele não melanoma (59 novos casos a cada 100 mil homens) em seguida próstata, pulmão, estômago, cólon/reto e esôfago (Quadro 1). Apesar do número absoluto de casos entre mulheres ser similar à incidência esperada entre homens (234.870), o que representa 50,3% do total de casos em

2008, o perfil é pouco diferente. Esperam-se 51 novos casos de câncer de pele não melanoma a cada 100 mil mulheres, seguidos pela incidência de câncer de mama colo de útero, cólon/reto, pulmão e estômago (INCA, 2007) (Quadro 2).

O número de casos, tanto no mundo como no Brasil, vem aumentando e isso se deve, principalmente, ao envelhecimento da população, pois o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer, em geral, é a idade e, obviamente, quanto mais se vive mais tempo há para que mutações genéticas adquiridas possam expressar o câncer (Gil, 2005).

O perfil do câncer no Brasil vem acompanhando o perfil observado em países desenvolvidos. As mudanças refletem o processo de urbanização e a ampliação do acesso à informação. O câncer está presente em todas as sociedades, mas em cada uma delas a doença apresenta um perfil específico. Num país com as dimensões e diferenças que o Brasil apresenta, as especificidades se revelam também entre as regiões e entre as capitais (INCA, 2007). O Sul e o Sudeste apresentam as maiores taxas esperadas de casos novos de câncer, enquanto a região Centro-Oeste apresenta padrão intermediário, refletindo as heterogeneidades regionais. A região Norte apresenta as menores taxas (INCA, 2007).

Quadro 1- Ordenação dos cinco principais tipos de câncer nas regiões brasileiras por 100 mil homens. Com exceção do câncer de pele não melanoma. Fonte: INCA.

	Sul	Centro-Oeste	Nordeste	Norte	Sudeste
1	próstata 68,7	próstata 46,7	próstata 38,0	próstata 22,0	próstata 63,2
2	pulmão 35,6	Pulmão 15,7	estômago 9,2	estômago 9,9	pulmão 22,5
3	estômago 20,9	estômago 12,2	pulmão 8,6	pulmão 8,0	cólon e reto 19,00
4	cólon e reto 20,6	cólon e reto 10,0	cavidade oral 5,9	leucemias 3,7	estômago 18,0
5	esôfago 16,6	cavidade oral 7,7	cólon e reto 4,4	cavidade oral 3,2	cavidade oral 15,2

Quadro 2- Ordenação dos cinco principais tipos de câncer nas regiões brasileiras por 100 mil mulheres. Com exceção do câncer de pele não melanoma. Fonte: INCA.

	Sul	Centro-Oeste	Nordeste	Norte	Sudeste
1	mama 67,1	mama 38,2	mama 28,4	colo do útero 22,2	mama 68,1
2	colo do útero 24,4	colo do útero 19,4	colo do útero 17,6	mama 15,6	cólon e reto 21,1
3	cólon e reto 21,9	cólon e reto 10,9	cólon e reto 5,8	estômago 5,4	colo do útero 17,8
4	pulmão 16,2	pulmão 8,8	estômago 5,5	pulmão 5,0	pulmão 11,4
5	estômago 10,4	estômago 6,0	pulmão 5,3	cólon e reto 3,8	estômago 9,5

1.1- Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é uma doença heterogênea e complexa, compreendendo múltiplas formas de apresentação clínica e morfológica, com diferentes graus de agressividade tumoral e potencial metastático (Silva et al., 2002).

Acredita-se que 90% a 95% de todos os CM sejam esporádicos e decorram de mutações somáticas que se verificam durante a vida e que 5% a 10% sejam hereditários em virtude de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estes indivíduos suscetibilidade ao CM (Bilimoria e Morrow, 1995; Barros, 2005).

Estima-se que aproximadamente 10% das mulheres da população geral dos países ocidentais desenvolverão, em alguma época da vida, o CM (Linhares et al., 2005).

O CM será, em 2008, o mais incidente entre as mulheres na região Sudeste. São estimados 68 novos casos a cada 100 mil mulheres, sendo a mais alta taxa de incidência do país (INCA, 2007). Em 2005, foram estimados 211.244 novos casos de CM nos EUA, com 41.410 mortes pela doença (Jemal et al., 2005). No Brasil, no ano de 2006 foram estimados

48.930 novos casos, com risco previsto de 52 casos novos por 100 mil mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanona (Da Silva e Amadei, 2006).

A incidência do CM tem distribuição geográfica variada, sendo mais freqüente em países ocidentais (EUA, Europa Ocidental) do que em países orientais (China, Japão). Acredita-se que além de fatores genéticos transmitidos existe grande influência dos hábitos das mulheres ocidentais que propiciam o surgimento da doença (alimentação, reposição hormonal, vida sedentária, obesidade) e isso explica porque mulheres japonesas que migram para os EUA, após duas gerações, têm incidência de CM semelhante à de mulheres americanas (Gil, 2005).

Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por CM continuam altas no Brasil, muito provavelmente porque ainda ocorram diagnósticos tardios. Com base nas informações disponíveis nos registros hospitalares do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no período de 2000/2001, 50% dos tumores de mama foram diagnosticados nos estágios III e IV (Da Silva e Amadei, 2006).

Acredita-se que o Brasil poderá acompanhar os países desenvolvidos no sentido de reduzir a mortalidade por essa doença apesar do envelhecimento progressivo da nossa população. O Brasil envelheceu em cinco anos o que a Europa demorou 150 anos para fazê-lo, e hoje tem expectativa de vida de 71 anos contra 37 anos do início do século XX (Gil, 2005).

Os sintomas do CM são o nódulo ou tumor na mama, acompanhado ou não de dor mamária. Podem surgir alterações na pele que recobre a mama, como abaulamentos, retrações ou aspecto semelhante à casca de laranja. Podem também surgir nódulos palpáveis na axila (INCA, 2007).

Os principais fatores de risco para o CM são:

- a) **Mudança dos fatores reprodutivos:** representada pela exposição estrogênica prolongada principal hormônio envolvido na proliferação da célula

mamária - com destaque ao estilo de vida dos países ocidentais, por exemplo menarca precoce (antes dos 11 anos de idade), menopausa tardia (em geral, após os 50 anos de idade), menos gestação e lactação, primeira gestação a termo mais tardiamente (acima de 30 anos), uso exógeno de hormônios. O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam sendo alvos de muita controvérsia. Aparentemente, certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam pílulas com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo têm maior risco (Parkin et al., 2001; Barros, 2005). Collins et al., (2005) em uma recente revisão sobre o risco de CM associado a tratamento de reposição hormonal na menopausa observaram que o risco é maior em mulheres em tratamento do que em mulheres não tratadas ou que interromperam o tratamento. Para essas últimas, o risco diminui logo após o término do tratamento atingindo os parâmetros normais de risco em cinco anos. Além disso, os autores referem que o risco de desenvolver CM é maior em mulheres que utilizam o estrogênio juntamente com a progesterona no tratamento de reposição hormonal, do que em mulheres que utilizam somente estrogênio;

- b) Fatores dietéticos:** com destaque para maior risco em dietas ricas em gordura, principalmente a poliinsaturada e a ingestão moderada de álcool (Barros, 2005). No entanto o efeito dos mesmos é ainda controverso (Parkin et al., 2001). Já as gorduras monoinsaturadas, ricas em ômega três e seis, como o azeite de oliva e outros alimentos, parecem ter efeito benéfico (Barros, 2005);
- c) Atividade física/controle do índice de massa corporal (IMC):** controle do peso, do IMC e atividade física têm efeito benéfico reduzindo o risco de CM, provavelmente por ocorrer menor produção endógena de estrógenos (Bagnoli et al., 2006);
- d) Exposição ambiental:** mulheres expostas à radiação ionizante, principalmente na puberdade (Barros, 2005);

e) História familiar: constitui um fator importante aumentando o risco em duas a três vezes, principalmente se o câncer ocorreu na mãe ou em irmã e antes da menopausa (Vaury et al., 1995).

Alguns trabalhos demonstram que, na população feminina, cada ano de amamentação reduz, em média, sete vezes o risco e cada filho nascido, em quatro vezes (Pinotti, 2005).

Na neoplasia de mama é consenso mundial o auto-exame mensalmente e exame clínico na faixa etária de 20 a 39 anos. Acima dos 40 anos, devem ser realizados o auto-exame, o exame clínico e anualmente a mamografia (Guimarães et al., 2006).

O Ministério da Saúde definiu o CM como sendo uma de suas prioridades e deverá estabelecer políticas públicas que incentivem o diagnóstico precoce através da mamografia e do estabelecimento de uma rede de atenção oncológica que passem pelos serviços de assistência básica, média e alta complexidade. A revisão da tabela de procedimentos do SUS também deverá incorporar novos tratamentos mais eficazes com o objetivo de diminuir a mortalidade pela doença (Gil, 2005).

Em países desenvolvidos, como os EUA, um número cada vez maior de CM é diagnosticado como resultado de uma alteração mamográfica. Isto explica porque os carcinomas ductais *in situ* são o subgrupo de CM que mais cresce em termos de diagnóstico nos EUA (Guimarães et al., 2006).

O objetivo dos exames de rastreamento para detecção precoce de CM é diagnosticar a doença antes que cause sintomas, melhorando o prognóstico e as opções de tratamento. Para ser reconhecido como eficaz, um método de rastreamento deverá proporcionar o aumento da sobrevida ou a redução da mortalidade pela doença. Apesar das controvérsias ao longo dos anos, a mamografia é o único método de rastreamento de CM que atinge esses objetivos. A evidência da eficácia da mamografia é maior hoje do que no passado e dados recentes confirmam o benefício do exame também em mulheres de 40 a 50 anos. As mulheres, mesmo com idade mais avançada, não devem interromper as mamografias de rotina. Aquelas mulheres com alto risco para CM podem se beneficiar de

estratégias adicionais de rastreamento, como iniciar a mamografia mais cedo e realizá-la em intervalos mais curtos (Eklund e Amaral, 2005).

Uma vez diagnosticado o CM, a escolha do tratamento depende do diagnóstico clínico da doença e do desejo do paciente (Da Silva e Amadei, 2006).

1.1.1- Suscetibilidade genética ao câncer de mama

A contribuição do ambiente no surgimento do câncer humano e também sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela suscetibilidade genética têm sido evidenciadas graças às pesquisas de epidemiologia molecular (Weinberg, 1992). Aliando-se a métodos moleculares, principalmente à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e a bioquímica, aos dados obtidos pela epidemiologia clássica, possibilita, não apenas o levantamento rápido dos riscos populacionais, mas também os individuais no surgimento de neoplasias (Feigelson et al., 1996; Shi et al., 1996; Kato et al., 1997). Com isso, consegue-se uma intervenção precoce e é fornecida uma base para o tratamento dessas neoplasias (Hussain e Harris, 1998).

Estudos de associação do tipo caso-controle têm gerado novas informações sobre o câncer e os mecanismos envolvidos no processo da carcinogênese (Bartsch, 2000). Para tanto, faz-se necessário o uso de biomarcadores que possam sinalizar eventos em amostras ou sistemas biológicos (Nebert et al., 1996).

Um tipo relevante de biomarcador de suscetibilidade está relacionado à presença de polimorfismos em genes que codificam enzimas cujas modificações podem aumentar ou diminuir a capacidade de substâncias mutagênicas/carcinogênicas interagirem com DNA, RNA ou proteínas (Eubanks, 1994; Guengerich, 2000). Sabendo-se que muitas destas substâncias não são capazes de provocar por si mesmas os efeitos prejudiciais ao organismo, mas somente quando alteradas por enzimas, ou alteração nos genes que as codificam desde que associados ao fenótipo, podem ser utilizada como biomarcador.

O desenvolvimento do câncer dependerá de uma série de fatores, como o tempo e a intensidade da exposição a carcinógenos e a suscetibilidade genética do indivíduo. Polimorfismos gênicos responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos influenciam diretamente na resposta individual a estes agentes, desde que alelos diferentes condicionem fenótipos com maior ou menor capacidade de metabolização tanto na biossíntese (genes da fase I), como na degradação (genes da fase II) de carcinógenos. Evidências epidemiológicas mostram que a herança de variações genéticas de um ou mais *locus* resultam na redução da capacidade de reparo do DNA e no aumento do risco de câncer (Sturgis et al., 1999).

O câncer é uma doença genética, mas não há nenhuma contradição em considerar o papel do ambiente na carcinogênese. Os agentes ambientais podem atuar como mutágenos que causam mutações somáticas. As mutações somáticas, por sua vez, são responsáveis pela carcinogênese. De acordo com algumas estimativas baseadas principalmente em dados dos resultados das bombas atômicas atiradas em Hiroshima e Nagasaki, até 75% do risco de câncer pode ser de origem ambiental (Nussbaum et al., 2002).

Vários genes estão envolvidos na suscetibilidade em desenvolver CM e polimorfismos que afetariam o metabolismo de drogas poderiam ser um deles, uma vez que levariam a uma maior exposição a vários fármacos que poderiam ter um efeito mutagênico.

Entre os polimorfismos mais conhecidos de metabolização de drogas estão os do sistema do citocromo P450.

1.2- Biotransformação de xenobióticos

Biotransformação é a alteração química sofrida pelos xenobióticos que são substâncias químicas naturais ou artificiais estranhas ao corpo, tais como drogas, produtos industriais, pesticidas, poluentes, alcalóides, metabólitos secundários de plantas e toxinas produzidas por fungos, plantas e animais (Parkinson, 1996) no organismo, comumente sob a ação de enzimas específicas e/ou inespecíficas (Meyer, 1996). Juntamente com os

fenômenos de absorção, distribuição e excreção, as enzimas participam da regulação de níveis plasmáticos de drogas. A biotransformação, portanto, é um processo alternativo, em que os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das drogas originais, com características mais hidrofílicas, tendo por objetivo facilitar a excreção pelo organismo (Meyer, 1996). Contudo, nem sempre as drogas são inativadas pelo contrário, alguns metabólitos apresentam atividade aumentada (por exemplo, codeína em morfina) ou propriedades tóxicas (entre elas, paration em paraoxon), incluindo a mutagenicidade, a teratogenicidade e a carcinogenicidade.

A exposição diária a uma variedade de compostos estranhos (xenobióticos) é capaz de levar à absorção deles através dos pulmões, da pele ou ingeridos, não intencionalmente, como contaminantes nos alimentos e na água ou, deliberadamente, na forma de medicamentos com fins terapêuticos ou não. A exposição a xenobióticos pode ser inadvertida ou acidental e às vezes inevitável. Alguns são inofensivos; outros, porém, podem provocar respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica. Essas respostas biológicas geralmente dependem da conversão da substância absorvida em um metabólito ativo ou não, com a finalidade principal de ser eliminada (Butlletí, 1999).

As enzimas, chamadas microssomas, são as responsáveis pelas reações de biotransformação e encontram-se presentes em todo o organismo, como pulmão, rins (Llama e Avendaño, 1993; Butlletí, 1999; Honkakoski e Neghishi, 1997), pele, cérebro, intestino (Watkins et al., 1987; Peters e Kremers, 1989), sangue e fígado (Watkins, 1992). Embora elas estejam distribuídas em todo o organismo, o fígado é, sem dúvida, o órgão que mais as concentra, sendo o principal órgão biotransformador.

Essas enzimas localizam-se predominantemente na superfície do retículo endoplasmático liso e constituem o sistema oxidase de função mista ou monoxigenases ou sistema citocromo P450 (Benet e Sheiner, 1987). Este possui importantes funções metabólicas, além de ser o sistema de sentinela que primeiro apreende e inativa vários xenobióticos no organismo. Para uma droga ser metabolizada pelas enzimas do sistema é necessário ser lipossolúvel, pois essa propriedade facilita a penetração dela no retículo endoplasmático e a sua ligação ao citocromo P450.

Muitas enzimas evoluíram para desintoxicação de compostos xenobióticos e a expressão gênica das mesmas é induzida em resposta à presença de determinado composto. O sistema de metabolização de xenobiótico humano compreende duas classes de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de fase I (Citocromo P450 - CYPs) e as enzimas conjugadas ou de fase II (glutathione S-transferases - GSTs e N-acetil-transferases - NATs).

Grande parte dos pró-carcinógenos químicos presentes no meio ambiente estão quimicamente inertes. Para tornarem-se metabólitos altamente reativos capazes de ligarem-se ao DNA e exibirem atividade carcinogênica, necessitam da ativação metabólica pelas enzimas oxidativas (de ativação) da fase I, que são principalmente enzimas da superfamília citocromo P450. Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno (Nebert, 1991; Perera, 1996; Shimada e Fujii-Kuriyama, 2004).

As ações das enzimas de fase I e II tornam os compostos mais solúveis, rapidamente excretados, o que pode diminuir o risco de câncer. Entretanto, os produtos mais solúveis de alguns compostos são ainda mais carcinógenos do que a forma original. Portanto, uma mutação que aumente a expressão gênica ou atividade da proteína produzida pode aumentar a quantidade de carcinógenos reativos formados e, então, aumentar o risco de câncer (Dunning et al., 1999).

Desta forma, os genótipos que conferem variações nos níveis de atividade enzimática das fases I e II estão associados à suscetibilidade individual ao desenvolvimento de câncer (Garte, 1998; Mendonça et al., 2003). Com isso, alguns indivíduos ou subpopulações, como diferentes etnias, podem apresentar risco significativamente maior de desenvolver câncer quimicamente induzido do que média populacional, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e desintoxicação (Idle, 1991; Gilliland, 1997; Caporaso, 1999).

Falhas nesses processos (fase I e fase II) favorecem o acúmulo de alterações ocorridas em regiões de proto-oncogenes e/ou genes supressores de tumor, que estimulam e inibem a proliferação celular, respectivamente, promovendo o surgimento de um tumor (Alberts et al., 2002).

A velocidade de biotransformação depende da concentração de citocromo P450, da proporção das isoformas, da afinidade pelo substrato, da redução do complexo droga-citocromo P450 e da competição entre substratos endógenos e exógenos (Relling e Evans, 1992). Alguns outros fatores também afetam a velocidade da biotransformação, como genéticos (polimorfismos), fisiológicos (doença, estado clínico, idade, sexo) e ambientais (poluentes e substâncias químicas industriais) ou por uso concomitante de outras drogas. Esses fatores podem levar a duas consequências antagônicas, inibição ou indução na velocidade de biotransformação, de suma importância no estabelecimento dos regimes terapêuticos (posologia).

As consequências da inibição correspondem a menor velocidade de biotransformação, aumento dos níveis do xenobiótico no organismo, aumento dos efeitos farmacológicos e maior incidência de toxicidade da droga. E as consequências da indução são aumento da síntese de proteínas, maior velocidade de biotransformação, menor disponibilidade da droga original e aumento de toxicidade, no caso de drogas metabolizadas para formas reativas (Benet e Scheiner, 1987).

A biotransformação é imprescindível, pois, se ela não ocorresse, o organismo seria um depósito de substâncias químicas estranhas por tempo indeterminado. Nesse sentido, as enzimas exercem um papel biológico de extrema importância, sobretudo as enzimas do citocromo P450, presentes nas membranas do retículo endoplasmático liso.

1.2.1- Citocromo P450 (CYPs)

A superfamília do citocromo P450 humana compreende ao menos dez conhecidas e caracterizadas famílias e numerosas subfamílias (Nebert, 1991). Durante a biotransformação, o citocromo P450 medeia as reações da fase I em que os xenobióticos são desintoxicados ou ativados pelas reações das substâncias intermediárias. A alta concentração das enzimas foi observada no retículo endoplasmático do fígado (microssoma), mas estão presentes em todos os tecidos de uma maneira tecido-específica. No fígado, determinam a intensidade e a duração da ação da droga e promovem o

desintoxicação dos xenobióticos. A contribuição de cada enzima P450 à ativação dos carcinógenos foi avaliada extensivamente e mostrou que a maioria dos carcinógenos ambientais estão ativados principalmente por um número limitado delas, incluindo as codificadas pelos genes CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP2D6, e CYP3A (Kawajiri et al., 1993). Muitos são polimórficos, indicando as atividades metabólicas diferentes, refletidas em efeitos tóxicos adversos, incluindo a carcinogênese induzida por substâncias químicas endógenas (Autrup, 2000).

O interesse pelo efeito carcinogênico das substâncias químicas data de pelo menos o século XVIII, quando se observou a alta incidência de câncer escrotal em jovens limpadores de chaminés. Hoje em dia, há uma preocupação quanto a muitos carcinógenos químicos possíveis, especialmente o tabaco, os componentes da dieta, os carcinógenos industriais e os dejetos tóxicos (Nussbaum et al., 2002).

1.2.1.1- Gene CYP1A1

Este gene pertence à subfamília *CYP1* e codifica a enzima aril-hidrocarboneto-hidroxilase (AHH), que é uma proteína induzível envolvida no metabolismo dos hidrocarbonetos policíclicos como os encontrados na fumaça do cigarro (Hatajima, 2002). A AHH converte os hidrocarbonetos na forma epóxido, que é mais facilmente excretada pelo corpo, mas que também é carcinogênica. A extensão do metabolismo dos hidrocarbonetos é geneticamente controlado e apresenta variação polimórfica na população normal. Os indivíduos que possuem um alelo de “alta inducibilidade”, sobretudo os fumantes, parecem correr um risco maior de câncer do pulmão. Os dados indicam que o próprio fumo de cigarros induz a expressão de gene CYP1A1 nas pessoas com um alelo de “alta inducibilidade”. Por outro lado, os homozigotos para o alelo recessivo de “baixa inducibilidade” parecem ser menos propensos a desenvolver câncer de pulmão, possivelmente porque sua AHH é menos efetiva no que se diz a respeito a converter os hidrocarbonetos em carcinógenos altamente reativos (Nussbaum et al., 2002).

O gene CYP1A1 está localizado no cromossomo 15, locus 15q22.24 (Hildebrand et al., 1985) e apresenta sete exons e seis introns (Masson et al., 2005).

Quatro polimorfismos foram descritos para o gene CYP1A1: m1, m2, m3 e m4 (Boyapati et al. 2005). O primeiro polimorfismo o m1 ou CYP1A1 *2A ou T6235C, é uma substituição de timina por uma citosina na região 3' não traduzida (Kawajiri et al., 1990); o segundo m2 ou CYP1A1 *2C ou A4889G, é conhecido também como Ile-Val (Hayashi et al., 1991) é uma substituição do aminoácido isoleucina para valina no códon 462 no exon 7 (Hayashi et al., 1991). Sua função não foi definida ainda completamente e pode depender de sua ligação ao polimorfismo m1 ou a outros polimorfismos que podem afetar os níveis da transcrição de CYP1A1, tais como polimorfismos nos genes do promotor, genes de AHR (receptor de Ah), ou a outros genes metabólicos (Crofts et al., 1994). O polimorfismo m2 tem sido associado com um aumento na inducibilidade e atividade da enzima *CYP1A1* (Crofts et al., 1994). O terceiro polimorfismo m3 ou CYP1A1 *3 foi encontrado apenas em afro-americanos e suas conseqüências funcionais restam ser definidas (Crofts et al., 1993). Por fim, o quarto polimorfismo m4 ou CYP1A1 *4 ou C4887A é uma substituição do aminoácido de treonina para asparagina no códon 461 adjacentes ao m2 no exon 7 (Boyapati et al. 2005) e foi descrito por Cascorbi et al. (1996). Sua freqüência é dez vezes maior em caucasianos do que em afro-americanos (4,0% contra 0,4%, respectivamente) e seu efeito funcional também resta ser determinado (Cascorbi et al. 1996).

Alguns trabalhos sugeriram que os polimorfismos m1 e m2 estariam associados a suscetibilidade ao CM, já os polimorfismo m3 e m4 não estariam associados ao CM (De Jong et al., 2006).

1.2.1.2- Gene CYP2D6

O gene CYP2D6 pertence à família *CYP2* e foi mapeado no cromossomo humano 22, locus 22q13.1 (Gough et al., 1993), contendo nove exons (Kimura et al., 1989) e oito introns (Topić et al., 2000). A enzima do CYP2D6 (debrisoquina-4-hidroxilase)

metaboliza a debrisoquina e pelo menos outras 80 drogas, como antidepressivos, antiarrítmicos e antiepiléticos, entre outras (Ayesh et al., 1984; Bertilsson, 1995; Autrup, 2000). Além destes substratos, CYP2D6 age também na nitrosamina (NNK-4-methilnitrosamina-1(3-piridil)-1-butanona), um componente do cigarro que é carcinogênico (Crespi et al., 1991). A ausência da atividade da debrisoquina-4-hidroxilase pode ter sérias consequências clínicas dependendo das doses utilizadas, uma vez que podem levar a uma alta concentração da droga no plasma, gerando efeitos colaterais (Bertilsson, 1995). Debrisoquina é uma droga usada para o tratamento de hipertensão e uma ampla variação foi observada na resposta hipotensiva (Idle et al., 1978).

Uma revisão complexa dos polimorfismos neste gene é fornecida por Sachse et al. (1997). De acordo com estes autores, os diferentes alelos para o gene CYP2D6 ocorrem principalmente por mutações de ponto, conversões, duplicações e deleções do gene. Cerca de 15 alelos foram descritos e associados com a baixa atividade (CYP2D6*2, * 9, * 10) ou ausência de atividade (CYP2D6*3, * 4, * 5, * 6, * 7, * 8, * 11, * 12, * 13, * 14, * 15, * 16). A combinação de todos estes alelos fornece um grande painel de possíveis fenótipos em relação às atividades do CYP2D6.

Alguns fenótipos são previstos, de acordo com os genótipos da seguinte forma, metabolizadores extensivos (EM) são indivíduos que possuem dois alelos selvagens; metabolizadores extensivos intermediários (IEM) possuem um alelo selvagem e um alelo com alteração e metabolizadores pobres ou lentos (PM) possuem os dois alelos alterados (Topić et al., 2000).

O polimorfismo *3 ou del2637A e o polimorfismo *4 ou G1934A estão entre os mais comuns do gene. Estes polimorfismos resultam em uma diminuição ou inatividade da isoenzima de *CYP2D6*, levando à uma PM. Esses indivíduos têm um risco aumentado de efeitos colaterais ou fracasso terapêutico após tratamento medicamentoso (Stüven et al., 1996).

1.2.1.3- Gene CYP19

O gene CYP19, localiza-se no cromossomo 15 (Sparkes et al., 1987) locus 15q21.1 (Chen et al., 1988), possuindo 70kb e apresenta 10 exons e a transcrição começa no exon 2 (Toda et al., 1990).

Esse gene codifica a enzima P450 aromatase a qual catalisa a biossíntese de estrógeno a partir de andrógenos. O gene CYP19 é polimórfico e o tetranucleotídeo TTTA localizado no intron 4, apresenta de sete a 13 repetições e tem sido associado ao CM em diferentes populações (Mendelson et al., 1990; Dunning et al., 1999; Kristensen e Borresen-Dale, 2000; Mitrinen e Hirvonen, 2003; Baxter et al., 2001). Sabe-se que a grande maioria dos estrógenos são produzidos nos ovários de mulheres na pré-menopausa, entretanto, os locais de conversão de andrógenos em estrógenos por aromatase são os tecidos adiposos periféricos em mulheres na pós-menopausa. Além disso, em pacientes com CM, a aromatase desempenha um papel importante na biossíntese de estrógenos intra-tumoral (O'Neill et al., 1988). P450 aromatase está presente no retículo endoplasmático das células, em que é expresso, incluindo células granulosas e corpo lúteo do ovário, células de Leydig dos testículos, da placenta e vários locais do cérebro e do tecido adiposo. Diferentes formas de estrógenos são sintetizadas a partir de diferentes substratos de andrógenos em vários tecidos. Por exemplo, o estrogênio é sintetizado a partir de androstenediona no tecido adiposo, estradiol a partir de testosterona nas células granulosas e oestriol a partir de andrógenos 16 α -hidroxilados na placenta (Healey, 2000).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Investigar a associação dos polimorfismos m1 e m2 no gene *CYP1A1*, os polimorfismos *3 e *4 no gene *CYP2D6* e polimorfismos de repetição em tandem no gene *CYP19* e o CM esporádico, em uma amostra de indivíduos da região metropolitana de Campinas.

2.2- Objetivos específicos

- Determinar a frequência gênica dos casos e controles dos polimorfismos:
 - T6235C (m1) e A4889G (m2) no gene *CYP1A1*;
 - A2637del (*3) e G1934A (*4) no gene *CYP2D6*;
 - [TTTA]_n no gene *CYP19*.
- Verificar se a distribuição genotípica dos polimorfismos estudados difere significativamente entre os casos e os controles.

3- METODOLOGIA

3.1- Casuística

Estudo de associação que analisou 170 indivíduos caucasóides divididos em dois grupos distintos, (I) Sendo 45 pacientes portadores de câncer de mama do tipo adenocarcinoma sem histórico familiar, da região metropolitana de Campinas, atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP e (II) 120 indivíduos saudáveis, sem diagnóstico de câncer de mama ou sem histórico familiar, atendidos no Programa de Planejamento Familiar do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) na UNICAMP.

Este estudo foi desenvolvido com DNA armazenado do projeto anterior aprovado pelo CEP e pela CONEP. A responsável pela guarda do material é a Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, orientadora deste trabalho de mestrado e responsável pela orientação genética dos pacientes. O protocolo de pesquisa foi aprovado e homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2005 (CEP 365/2005) (Anexo 1).

Um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos participantes (Anexo 2) e um questionário foi utilizado para obter informações detalhadas sobre a história clínica e exames de biópsia mamária dos pacientes e para os controles foi utilizada para obter informações para critérios de inclusão ou exclusão (Anexo 3).

3.1.1- Critérios de inclusão dos casos

- Pacientes com CM, sem histórico familiar e idade de manifestação entre 18 a 55 anos.

3.1.2- Critérios de exclusão dos casos

- Pacientes com CM, com histórico familiar e/ou com idade de manifestação menor que 18 anos ou maior que 55 anos.

3.1.3- Critérios de inclusão para indivíduos do grupo controle

- Não possuir diagnóstico de CM;
- Não possuir histórico familiar de CM, ovário ou próstata.

3.2- Métodos

A extração de DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio pelo projeto anterior da seguinte forma:

3.2.1- Extração de DNA

A extração do DNA genômico das amostras colhidas foi realizada utilizando-se protocolos manuais de extração de DNA com fenol-clorofórmio. Vinte a 30 mL de sangue venoso foram colhidos dos indivíduos recrutados para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde estão localizados os leucócitos foi transferida para um tubo de propileno com fundo cônico. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1x (até completar um volume de 11mL) e 60µl de Nonidet. A solução foi então centrifugada a 2900 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três mL de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100mg/mL) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação foram acrescentados 3 mL de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5 mL de fenol e 1,5 mL de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3 mL de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado com 6,0 mL de etanol absoluto. Esse método propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700µg a partir de 20 mL de sangue venoso).

3.2.2- Análises dos polimorfismos

▪ Polimorfismo m1 do gene CYP1A1

A análise do polimorfismo m1 foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio do protocolo:

- 1 µL dos iniciadores M1-S e M1-AS (20 pmoles) (Imprint do Brasil Ltda.) (Tabela 1);

- 2 µL de dNTPs (1,25 mM) cada;

- 2 µL de Taq DNA polimerase (5 U) (Fermentas);

- 5 µL de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl;

- 4 µL de MgCl₂ (50 mM);

- 34 µL de água ultra-pura estéril.

Tabela 1- Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação gênica

Gene	Polimorfismo		Sequência	Referência
<i>CYP1A1</i>	m1	Direto	5' GGC TGA GCA ATC TGA CCC TA 3'	Krajinovic et al.,1999
		Reverso	5' TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT 3'	
	m2	Direto	5' CTG TCT CCC TCT GGT TAC AGG AAGC 3'	Krajinovic et al.,1999
		Reverso	5' TTC CAC CCG TTG CAG CAG GAT AGCC 3'	
<i>CYP2D6</i>	*3	Direto	5' GAT GAG CTG CTA ACT GAG CCC 3'	Krajinovic et al.,1999
		Reverso	5' CCG AGA GCA TAC TCG GGAC 3'	
	*4	Direto	5' GCC TTC GCC AAC CAC TCCG 3'	Krajinovic et al.,1999
		Reverso	5' AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC 3'	
<i>CYP19</i>	[TTTA] _n	Direto	5' GCA GGT ACT TAG TTA GCT AC 3'	Baxter et al., 2001
		Reverso	5' TTA CAG TGA GCC AAG GTC GT 3'.	

Todos os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 1,5 mL (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação.

Em cada microtubo de 0,2 mL foi pipetado 1µL do DNA genômico (20 ng/µL) previamente extraído e 49µL da mistura de reação, somando um volume total de 50 µL. Em cada análise foi usado como controle negativo um microtubo contendo água no lugar do DNA genômico. Os microtubos foram levados ao termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, Inc.) e submetidos ao programa:

- o 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- o 34 ciclos: 94°C por 1 minuto, 63,5°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos;
- o 1 ciclo: 72°C por 7 minutos.

Para verificação da amplificação da PCR foi retirada uma alíquota de 7µL de produto de PCR e misturada com 3µL de corante azul de bromofenol (15mL de ficol, 20mL de H₂O e 0,0125g de azul de bromofenol). Foi então realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Uma vez confirmada esta amplificação, realizou-se a segunda etapa por meio da clivagem com a enzima *MspI* (Promega Corporation, USA), de acordo com o protocolo seguinte:

- 1 U de enzima de restrição *MspI*;
- 2µL de tampão da enzima: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl₂;
- 2µL de água ultra-pura estéril.

Os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 1,5 mL (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação. Em cada microtubo de 0,5 mL foi pipetado 15µL do produto da PCR e 5µL da mistura de reação, somando um volume total de 20µL. A reação permaneceu a 37°C cerca de 16 horas.

A eletroforese do produto da clivagem foi realizada em gel de agarose a 1,5% em Tampão TBE, a 80 volts. A cuba para eletroforese continha tampão TBE 1x (Solução 10x: 121,1g de Tris, 61,83g de ácido bórico, 40mL de EDTA 0,5M e água ultra-pura para completar volume de 1000mL). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (10mg/mL) por cerca de 10 minutos. O gel foi então observado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado.

Os iniciadores M1-S e M1-AS originam um produto de amplificação de 899 pb com padrão de migração idêntico ao genótipo homozigoto selvagem (+/+), uma vez que este não sofre ação da enzima de restrição *MspI*, originando uma banda não clivada. O polimorfismo gera um sítio de restrição para a enzima *MspI* que cliva o produto da amplificação e, dessa maneira o genótipo homozigoto mutante (-/-) gera duas bandas de 693 pb e 206 pb enquanto o genótipo heterozigoto (+/-) corresponde as três bandas de 899, 693 e 206 pb (Krajinovic et al.,1999), como mostra a Figura 1:

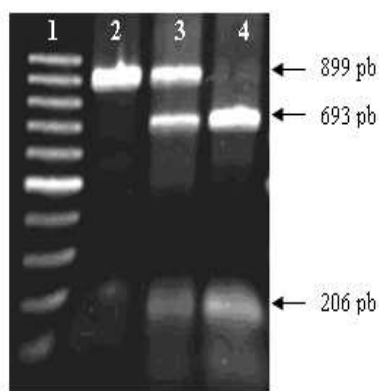


Figura 1- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo **m1**. Em 1: marcador de peso molecular de 100 pb; em 2: genótipo homozigoto selvagem 899 pb; em 3: genótipo heterozigoto 899, 693 e 206 pb; em 4: genótipo homozigoto mutante 693 e 206 pb.

▪ Polimorfismo m2 do gene CYP1A1

A análise do polimorfismo m2 foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio do protocolo:

- 1 µL dos iniciadores M2-S e M2-AS (20 pmoles) (Imprint do Brasil Ltda.) (Tabela 1);
- 2 µL de dNTPs (1,25 mM);
- 2 µL de Taq DNA polimerase (5 U) (Fermentas);
- 5 µL de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl;
- 4 µL de MgCl₂ (50 mM);
- 34 µL de água ultra-pura estéril.

Todos os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 0,2 mL. Os microtubos foram levados ao termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, Inc.) e submetidos ao programa:

- o 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- o 34 ciclos: 94°C por 1 minuto, 63,5°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos;
- o 1 ciclo: 72°C por 7 minutos;

Para verificação da amplificação da PCR foi retirada uma alíquota de 10µL de produto de PCR e misturada com 5µL de corante azul de bromofenol. Foi então realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (3,0mL de TBE 10x; 9,0mL de poliacrilamida 40%; 17,79mL de água ultra-pura estéril; 210,0µL de persulfato de amônio 10% e 35,0µL de TEMED). Uma vez confirmada esta amplificação, realizou-se a segunda etapa através da clivagem com a enzima *Bse*MI (Fermentas Life Sciences), de acordo com o protocolo seguinte:

- 1U de enzima de restrição *Bse*MI;
- 1µL de tampão da enzima: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl₂;
- 3µL de água ultra-pura estéril.

Os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 0,5 mL. Em cada microtubo foram pipetados 5µL do produto da PCR e 5µL da mistura de reação, somando um volume total de 10µL. A reação permaneceu a 55°C durante cerca de 16 horas.

A eletroforese do produto da clivagem foi realizada em gel de poliacrilamida a 12%, a 180 volts. A cuba para eletroforese continha tampão TBE 1x. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo por cerca de 10 minutos. O gel foi então observado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado.

Os iniciadores M2-S e M2-AS originam um produto de amplificação de 204 pb com padrão de migração idêntico ao genótipo homozigoto mutante (-/-), uma vez que este não sofre ação da enzima de restrição *Bse*MI, originando uma banda não clivada. O genótipo homozigoto selvagem (+/+), gera um sítio para a enzima de restrição *Bse*MI, que cliva o produto de amplificação, gerando duas bandas de 149 pb e 55 pb e o genótipo heterozigoto (+/-) corresponde as três bandas de 204, 149 e 55 pb (Krajinovic et al.,1999), como mostra a Figura 2:

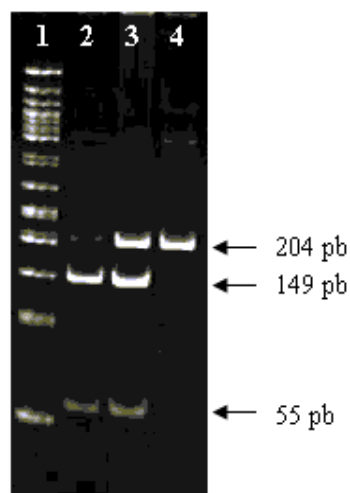


Figura 2- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo **m2**. Em 1: marcador de peso molecular de 50 pb; em 2: genótipo homozigoto selvagem 149 e 55 pb; em 3: genótipo heterozigoto 204, 149 e 55 pb; em 4: genótipo homozigoto mutante 204 pb.

▪ Polimorfismo *3 do gene CYP2D6

A análise do polimorfismo *3 foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio do protocolo:

- 1 µL dos iniciadores *3-S e *3-AS (20 pmoles) (Imprint do Brasil Ltda.) (Tabela 1);
- 2µL de dNTPs (1,25 mM);
- 2 µL de Taq DNA polimerase (5 U) (Fermentas);
- 5 µL de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl
- 3 µL de MgCl₂ (50 mM);
- 35 µL de água ultra-pura estéril.

Todos os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 0,2 mL. Os microtubos foram levados ao termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, Inc.) e submetidos ao programa:

- o 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- o 34 ciclos: 94°C por 1 minuto, 64,5°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos;
- o 1 ciclo: 72°C por 7 minutos;

Para verificação da amplificação da PCR foi retirada uma alíquota de 10µL de produto de PCR e misturada com 5µL de corante azul de bromofenol. Foi então realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Uma vez confirmada esta amplificação, realizou-se a segunda etapa por meio da clivagem com a enzima *MspI* (Promega Corporation, USA) de acordo com o protocolo seguinte:

- 0,5 U de enzima de restrição *MspI*;
- 2 µL de tampão da enzima: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl₂;
- 2,5 µL de água ultra-pura estéril.

Os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 0,5 mL. Em cada microtubo foram pipetados 15µL do produto da PCR e 5µL da mistura de reação, somando um volume total de 20µL. A reação permaneceu a 37°C durante cerca de 16 horas.

A eletroforese do produto da clivagem foi realizada em gel de poliacrilamida a 12%, a 180 volts. A cuba para eletroforese continha tampão TBE 1x. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo por cerca de 10 minutos. O gel foi então observado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado.

Os iniciadores *3-S e *3-AS originam um produto de amplificação de 270 pb com padrão de migração idêntico ao homozigoto mutante (-/-), uma vez que este não sofre ação da enzima de restrição *MspI*, originando uma banda não clivada, não identificada na presente amostra. O genótipo homozigoto selvagem (+/+) possui um sítio para a enzima de restrição *MspI*, que cliva o produto de amplificação, gerando duas bandas de 188 pb e 82 pb e o genótipo heterozigoto (+/-) corresponde as 3 bandas de 270, 188 e 82 pb (Krajinovic et al.,1999), como mostra a Figura 3:

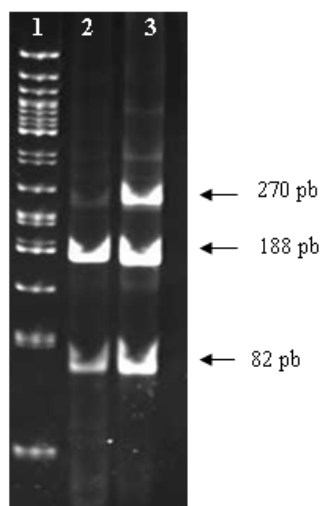


Figura 3- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo *3. Em 1: marcador de peso molecular de 50 pb; em 2: genótipo homozigoto selvagem 188 e 82 pb; em 3: genótipo heterozigoto 270, 188 e 82 pb.

▪ Polimorfismo *4 do gene CYP2D6

A análise do polimorfismo *4 foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio do protocolo:

- 1 µL dos iniciadores *4-S e *4-AS (20 pmoles) (Imprint do Brasil Ltda.) (Tabela 1);
- 2 µL de dNTPs (1,25 mM);
- 2 µL de Taq DNA polimerase (5 U) (Fermentas);
- 5 µL de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl;
- 3 µL de MgCl₂ (50 mM);
- 35 µL de água ultra-pura estéril.

Todos os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 0,2 mL. Os microtubos foram levados ao termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, Inc.) e submetidos ao programa:

- o 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- o 34 ciclos: 94°C por 1 minuto, 65,5°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos;
- o 1 ciclo: 72°C por 7 minutos.

Para verificação da amplificação da PCR foi retirada uma alíquota de 10µL de produto de PCR e misturada com 5µL de corante azul de bromofenol. Foi então realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Uma vez confirmada esta amplificação, realizou-se a segunda etapa por meio da clivagem com a enzima *Mva* I (Fermentas Life Sciences), de acordo com o protocolo seguinte:

- 0,5 U de enzima de restrição *Mva* I;
- 1,5µL de tampão da enzima: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl₂;
- 3µL de água ultra-pura estéril.

Os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 0,5 mL. Em cada microtubo foram pipetados 10µL do produto da PCR e 5µL da mistura de reação, somando um volume total de 15µL. A reação permaneceu a 37°C durante cerca de 16 horas.

A eletroforese do produto da clivagem foi realizada em gel de poliacrilamida a 12%, a 180 volts. A cuba para eletroforese continha tampão TBE 1x. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo por cerca de 10 minutos. O gel foi então observado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado.

Os iniciadores *4-S e *4-AS originam um produto de amplificação de 355 pb com padrão de migração idêntico ao homozigoto mutante (-/-) uma vez que este não sofre ação da enzima de restrição *Mva* I, originando uma banda não clivada. O genótipo homozigoto selvagem (+/+), possui um sítio para a enzima de restrição *Mva* I, que cliva o produto de amplificação, gerando duas bandas de 222 pb e 133 pb e o genótipo heterozigoto (+/-) corresponde as três bandas de 355, 222 e 133 pb (Krajinovic et al.,1999), como mostra a Figura 4:

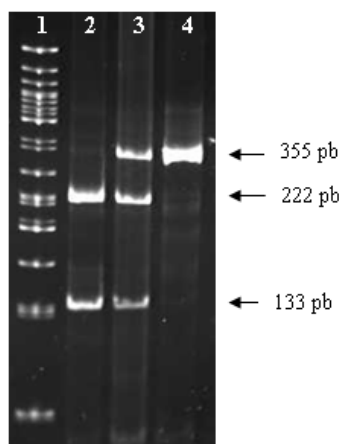


Figura 4- Padrão de bandas para detecção do polimorfismo *4. Em 1: marcador de peso molecular de 50 pb; em 2: genótipo homozigoto selvagem 222 e 133 pb; em 3: genótipo heterozigoto 355, 222 e 133 pb; em 4: genótipo homozigoto mutante 355 pb.

▪ **[TTTA]_n do gene CYP19**

A análise do gene CYP19 foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio do protocolo:

- 0,25 µL dos iniciadores 19-S e 19-AS (um deles marcado com fluorescência azul - FAM); (Imprint do Brasil Ltda.) (Tabela 1);
- 1,0 µL de dNTPs (1,25 mM);
- 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U) (Fermentas);
- 1,0 µL de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl;
- 0,7 µL de MgCl₂ (50 mM);
- 6,5 µL de água ultra-pura estéril.

Todos os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 0,2 mL. Os microtubos foram levados ao termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, Inc.) e submetidos ao programa:

- 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- 34 ciclos: 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos;
- 1 ciclo: 72°C por 7 minutos.

O tamanho dos fragmentos foi observado pela genotipagem automática, que foi realizada em um seqüenciador de capilar do modelo MegaBACE 1000, adaptado para genotipagem através de um conjunto específico de filtros e a análise foi feita em um *software Fragment Profiler v1.2*. Em uma placa de 96 amostras, os produtos da PCR foram diluídos em água (1:20). Em seguida, 2µl de cada diluição foi distribuída em outra placa de 96 amostras previamente preparada com um mistura contendo 7,75µl de *Genotyping Loading Solution* (0,1% de *Tween 20* em H₂O) + 0,25µl de *MegaBACE Size standards*

ET550-R, perfazendo um volume final de 10µl por amostra em placa própria para o MegaBACE. As amostras foram desnaturadas a 95°C por três minutos antes de serem injetadas no MegaBACE.

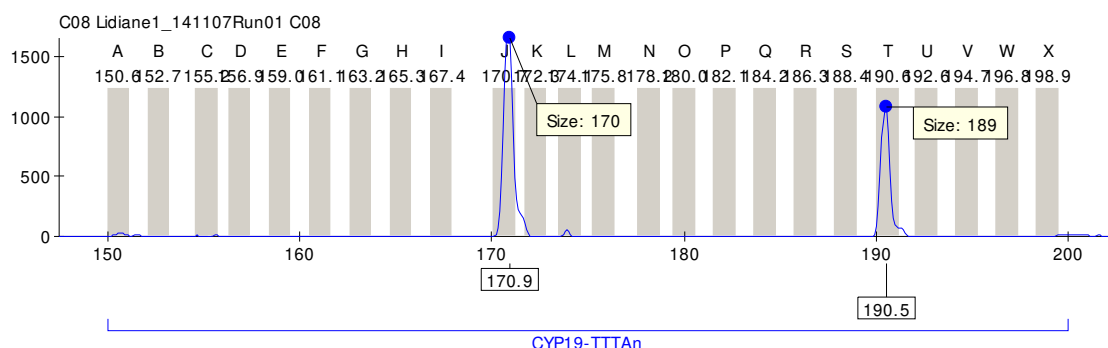


Figura 5- Genotipagem do *CYP19*

3.3- Análise estatística

As frequências genótípicas observadas foram comparadas com as esperadas, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para analisar a associação entre as variantes polimórficas estudadas e o câncer de mama, foram comparadas as frequências dos genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP19* de indivíduos portadores de câncer de mama com as de indivíduos controles, através do teste do Qui-quadrado. O valor de $p \leq 0,05$ foi adotado como limite de significância.

4- RESULTADOS

Os genótipos dos controles encontram-se no Anexo 4 e os parâmetros clínicos e histopatológicos relativos aos tumores dos pacientes, assim como os respectivos genótipos estão apresentados no Anexo 5.

Nos controles (n = 120) a idade variou entre 21 a 100 anos e a média das idades foi de 43 anos. A idade de diagnóstico nos casos variou entre 19 a 55 anos e a média das idades foi de 40. Apenas cinco pacientes apresentaram câncer de mama bilateral.

As análises dos diferentes parâmetros clínicos, como a idade do diagnóstico, carcinoma bilateral, tipo histológico do carcinoma, subtipo histológico do tumor, gradação do carcinoma invasivo, receptor de estrógeno e progesterona, não apresentaram diferenças significativas pelo teste do Qui-quadrado.

Pacientes e controles são do sexo feminino, brancos classificados quanto a cor de pele por um único avaliador.

Quadro 3- Distribuição genotípica dos alelos m1 e m2 do gene CYP1A1 entre os casos de CM e controles

	CYP1A1							
	m1				m2			
	Controles	Casos	$\chi^2_{(2)}$	<i>p</i>	Controles	Casos	$\chi^2_{(2)}$	<i>p</i>
	n= 109	n= 42	1,12	0,57	n= 120	n= 43	0,83	0,65
Homozigoto Selvagem	76	28	1,12	0,57	96	34	0,83	0,65
Heterozigoto	27	13			22	9		
Homozigoto Mutante	6	1			2	0		

O alelo m1 apresentou frequência gênica de 0,18 nos casos e 0,18 nos controles, enquanto para o alelo m2 entre os casos e controles foram de 0,10 e 0,11, respectivamente.

A distribuição genotípica do m1 mostrou-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos casos $\chi^2 = 0,00$; $p = 1$ e nos controles $\chi^2 = 2,68$; $p = 0, 26$. E a distribuição genotípica do m2 mostrou-se também de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos casos $\chi^2 = 0,7$; $p = 0,78$ e nos controles $\chi^2 = 0,31$; $p = 0, 85$.

Quadro 4- Distribuição genotípica dos alelos *3 e *4 do gene CYP2D6 entre os casos de CM e controles

	CYP2D6							
	*3				*4			
	Controles	Casos	$\chi^2_{(2)}$	p	Controles	Casos	$\chi^2_{(2)}$	p
	n= 120	n= 43	0,15	0,69	n= 120	n= 43	2,41	0,30
Homozigoto Selvagem	116	41			78	33		
Heterozigoto	4	2			40	10		
Homozigoto Mutante	0	0			2	0		

O alelo *3 apresentou uma frequência gênica de 0,02 nos casos e 0,01 nos controles. A distribuição genotípica mostrou-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos casos $\chi^2 = 1,93$; $p = 0,16$ e nos controles $\chi^2 = 0,03$; $p = 0, 98$, respectivamente.

O alelo *4 apresentou uma frequência gênica de 0,11 nos casos e 0,18 nos controles. A distribuição genotípica mostrou-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg $\chi^2 = 1,24$; $p = 0,53$ e $\chi^2 = 1,54$; $p = 0, 46$, respectivamente.

Tabela 2- Comparação das atividades metabólicas previstas a partir dos genótipos entre casos e controles dos polimorfismos *3 e *4

Grupos	n.	Genótipos		
		EM %	IEM %	PM %
Controle	120	60,8	37,5	1,7
Caso	43	72	28	0

Na Tabela 2 foi realizado uma comparação por níveis de metabolização entre o grupo controle e o grupo caso, dos polimorfismos *3 e *4 e nenhuma diferença estatística entre os grupos foi encontrada ($\chi^2_{(2)} = 2,18$; $p = 0,33$).

Tabela 3- Distribuição alélica do gene CYP19 entre os casos de CM e controles

Alelo	pb	Controles		Casos		p
[TTTA] ₇ - TCT	170	73	39,67%	22	34,37%	0,45
[TTTA] ₇ + TCT	173	41	22,28%	16	25%	0,65
[TTTA] ₈	177	17	9,24%	6	7,81%	0,73
[TTTA] ₉	181	1	0,54%	0	0,00%	0,55
[TTTA] ₁₀	185	4	2,17%	2	3,12%	0,67
[TTTA] ₁₁	189	43	23,37%	20	28,12%	0,44
[TTTA] ₁₂	193	5	2,72%	2	1,56%	0,60
[TTTA] ₁₃	197	0	0,00%	0	0,00%	0,00

Foram analisados 92 controles e 32 casos. Os alelos do polimorfismo do gene CYP19, na amostra controle e de casos encontra-se sumarizada na Tabela 3.

Tanto nos casos ($\chi^2_{(8)} = 3,94$, $p = 0,86$) como nos controles ($\chi^2_{(8)} = 1,83$, $p = 0,98$) os genótipos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as médias nos genótipos CYP1A1 m1, CYP1A1 m2, CYP2D6*3, CYP2D6*4 e dos alelos do CYP19.

5- DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados polimorfismos dos genes CYP1A1, CYP2D6 e CYP19 e a suscetibilidade ao CM esporádico, em um estudo de associação. A escolha destes genes deve-se ao seu potencial como marcadores de suscetibilidade para diferentes tipos de câncer, indicando indivíduos ou populações com diferenças genéticas capazes de modular a suscetibilidade ao CM.

Dumitrescu e Cotarla (2005) afirmam, em artigo de revisão, que os polimorfismos nos genes CYP1A1, CYP2D6 e CYP19 são de baixa penetrância e estão associados ao aumento ou decréscimo ao risco de CM.

Dois polimorfismos do gene CYP1A1 são freqüentemente estudados e associados com risco de desenvolver câncer de mama, T6235C na região 3' não traduzida e A4889G códon 462 (Ile/Val) (Ambrosone et al.,1995; Moysich et al.,1999; Krajinovic et al., 2001; Basham et al., 2001; Laden et al., 2002).

A análise do polimorfismo m1 do gene CYP1A1 neste estudo não apresentou associação com o CM ($p = 0,75$) e tal resultado está de acordo Taioli et al. (1995) e Bailey et al. (1998) que analisaram populações caucasóides americanas. Li et al. (2004), em uma amostra da população da Carolina do Norte nos Estados Unidos, também não encontraram significância estatística para m1 e o CM.

Taioli et al. (1995) relataram uma associação significativa entre as portadoras do polimorfismo m1 e o risco de câncer de mama em mulheres afro-americanas (OR = 9,7; 95% CI = 2,0-47,9), resultado similar foi publicado em mulheres na pós-menopausa de Formosa por Huang et al. em 1999, (OR = 1,98; 95% CI = 1,01-3,99), também foi sugerido por Shin et al. (2007) em uma amostra de mulheres da Coréia, que o polimorfismo m1 pode aumentar a suscetibilidade ao CM. Chacko et al. (2005) analisou mulheres da Índia e demonstrou diferença estatística significativa entre os casos e controles de m1 (OR = 4,0; 95% CI = 1,2-13,1; $p = 0,02$) para os homozigotos m1 e para os heterozigotos m1 (OR = 3,2; 95% CI = 1,7-6,0; $p = 0,0005$). Ao contrário, Miyoshi *et al* (2002) e Da Fonte de Amorim et al. em 2002, mostraram uma associação entre o polimorfismo m1 e o risco diminuído para o CM em mulheres japonesas (OR = 0,60; 95% CI = 0,41-0,88) e em mulheres brasileiras não caucasianas (OR = 0,30; 95% CI = 0,12-0,76), respectivamente .

Os resultados deste trabalho para *CYP1A1* m2 ($p = 0,56$) concordam com os estudos de Rebbeck et al. (1994); Taioli et al. (1995); Bailey et al. (1998); Shin et al. (2007) que não encontraram associação com risco do CM e o polimorfismo m2. Huang et al. (1999) também não encontraram resultados significantes para o polimorfismo m2, porém pesquisaram mulheres na pós-menopausa.

Miyoshi et al. (2002) verificaram que mulheres japonesas portadoras do polimorfismo m2 apresentam um risco diminuído para o câncer de mama (OR = 0,66; 95% CI = 0,45-0,96), mas um risco aumentado foi encontrado entre mulheres caucasianas fumantes na pós-menopausa por Ambrosone et al. em 1995 (OR = 5,22; 95% CI = 1,16- 23,56) e entre fumantes por Ishibe et al. em 1998 (OR = 3,61; 95% CI = 1,11-11,7). Chacko et al. (2005) analisaram mulheres da Índia e demonstraram diferença estatística significativa entre os casos e os controles de m2 (OR = 4,9; 95% CI = 1,3-18,4; $p = 0,01$) para homozigotos m2 e (OR = 2,4; 95% CI = 1,3-4,6; $p = 0,007$) para heterozigotos m2.

Moysich et al. (1999), identificaram um risco significativamente aumentado do CM entre as portadoras de m2 (OR = 2,9; 95% CI = 1,18-7,45).

Polimorfismos em *CYP2D6* são detectados em diversos tipos de câncer. Estão entre os mais comuns os *3 e *4 com uma frequência de 2,7 e de 28,6%, respectivamente (Topić et al., 2000).

Estatisticamente não significativa, a comparação da distribuição dos genótipos entre os casos de CM e controles, dos polimorfismos *3 ($p = 0,81$) e *4 ($p = 0,23$) do gene *CYP2D6* e das atividades metabólicas dos casos (EM: 85%; IEM: 15%; PM: 0% e $p = 0,49$) deste trabalho foi similar as investigações dos autores: Topić et al. (2000) realizado na Croácia (EM: 67,1%; IEM: 27,6%; PM: 5,3% e $p = 0,164$), Smith et al. (1992) em 437 pacientes com CM do Reino Unido (66,8% de EM, 29,3% de IEM e 3,9% de PM e $p = 0,90$) e de Wolf et al. (1993) em 720 indivíduos também do Reino Unido (66,8% de EM; 29,4% de IEM e 3,8% de PM).

Anthony et al.(1995) postularam que o fenótipo PM pode ser um fator de risco para o CM em mulheres na pós-menopausa.

Ladona et al. (1996) relacionaram um risco aumentado de CM em heterozigotos (EIM) para o polimorfismo *4, que foi mais elevado nos pacientes do que nos controles (31% contra 19,9%; OR = 1,81; 95% CI = 1,06-3,11; $p = 0,02$) em mulheres espanholas.

No polimorfismo [TTTA]_n, os alelos [TTTA]₇, [TTTA]₁₀ e [TTTA]₁₂ têm sido associados como possíveis alelos para a suscetibilidade ao CM (Kristensen et al.,1998; Siegelmann-Danieli e Buetow, 1999; Haiman et al., 2000).

Kristensen et al. (1998) estudaram a associação entre polimorfismos do CYP19 e o risco do CM entre casos e controles norueguesas e suecas, relatando que os portadores do alelo [TTTA]₁₂ apresentam um risco significativamente maior para o CM (OR = 2.42, 95% CI = 1.03-5.80). Conflitando com o resultado da associação significativa do alelo [TTTA]₁₂ Siegelmann-Danieli e Buetow (1999), em um estudo entre mulheres caucasianas, observaram uma baixa frequência do alelo 12, e uma elevada frequência do alelo 7 entre os casos e controles ([TTTA]₁₂: 1,6% contra 5,3%; [TTTA]₇: 18,5% contra 13,4%).

Haiman et al. (2000) em um estudo em Massachusetts identificaram [TTTA]₁₀ como um alelo de risco elevado, quando comparados casos e controles ([TTTA]₁₀: 2,3% contra 0,7%, $p = 0,005$). Este mesmo achado foi observado por Baxter et al. (2001) em uma amostra da população britânica ([TTTA]₁₀: 1,5% contra 0,2%, $p = 0,028$) e este mesmo estudo identificou [TTTA]₈ (13,5% contra 8,7%, $p = 0.012$) com o risco aumentado para o CM, também Ribeiro et al. (2006) identificaram [TTTA]₁₀ três vezes mais frequente nos casos do que nos controles, apresentando uma associação positiva com o CM ($p = 0,048$) em uma amostra de mulheres do Rio de Janeiro, no Brasil.

Nem todos os estudos observaram o alelo [TTTA]₁₀ associados ao CM. Probst-Hensch et al. (1999) constataram que a frequência do alelo [TTTA]₁₀ varia consideravelmente entre os casos de CM das afro-americanas, japonesas, latinas e de não latinas brancas (0-3%) e, nestes grupos, a frequência do alelo [TTTA]₁₀ foi maior entre os

controles do que nos casos. Os resultados do presente trabalho também não apresentaram significância estatística entre o CM e os alelos [TTTA]₇, [TTTA]₁₀ e [TTTA]₁₂.

Como se pode observar no desenvolvimento deste trabalho, os resultados sobre a associação dos genes estudados e o risco de desenvolvimento de CM são em geral controversos. Este fato pode ser devido tanto a fatores biológicos, como as diferentes distribuições gênicas em diferentes etnias, a desequilíbrios de ligação (Pharoah et al., 2004), a exposição a fatores ambientais (Dunning et al., 1999).

Os resultados desta pesquisa sugerem que os polimorfismos gênicos estudados não estariam associados ao CM nesta amostra.

6- CONCLUSÕES

Com relação à presente amostra:

1. As distribuições genotípicas do gene CYP1A1, CYP2D6 e CYP19 em indivíduos do grupo caso e controle se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg.
2. As frequências gênicas encontradas entre os casos foram: 0,18 para m1 e 0,10 para m2 (gene CYP1A1), 0,02 para *3 e 0,11 para *4 (gene CYP2D6) e 34,37; 25; 7,81; 3,12; 28,12; 1,56 para [TTTA]₇ –TCT, + TCT, 8, 10, 11, 12 (gene CYP19), respectivamente.
3. As frequências gênicas encontradas entre os controles foram: 0,18 para m1 e 0,11 para m2 (gene CYP1A1), 0,01 para *3 e 0,18 para *4 (gene CYP2D6) e 40; 22,28; 9,24; 0,54; 2,17; 23,37; 2,72 para [TTTA]₇ –TCT, + TCT, 8, 9, 10, 11, 12 (gene CYP19), respectivamente.
4. Não foi encontrada associação dos polimorfismos estudados dos genes CYP1A1, CYP2D6 e CYP19 e o câncer de mama esporádico na amostra de indivíduos da região metropolitana de Campinas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ed., Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p.1255-91.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 4ª ed., New York: Garland Science, 2002.

Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, et al. Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Res* 1995; 55: 3483–5.

Anthony LB, Thomas JB, Hande KR. Cytochrome P-450IID6 phenotyping in câncer patients: debrisoquine and dextromethorphan as probes. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36: 125– 8.

Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Research*, 2000; 464: 65-76.

Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ, Hetzel MR. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature*, 1984; 312: 169-170.

Bagnoli VR, Da Fonseca AM, Arie WMY. Assistência à mulher climatérica tratada de neoplasia maligna. In: Guimarães JRQ. *Manual de Oncologia*. 2a ed. São Paulo: BBS Editora; 2006. p. 607- 612.

Bailey LR, Roodi N, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African-Americans. *Cancer Res* 1998; 58: 65–70.

Barros AC. Qual(is) é(são) a(s) causa(s) do câncer de mama? In: Boff RA e Wisintainer F. *O que as mulheres querem saber sobre câncer de mama. As 100 perguntas mais freqüentes*. 3ª ed. Caxias do Sul: Mesa Redonda; 2005. p.33-34.

Bartsch H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat Res* 2000; 462: 255-279.

Basham VM, Pharoah PD, Healey CS, Luben RN, Day NE, Easton DF, et al. Polymorphisms in *CYP1A1* and smoking: no association with breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1797–800.

Baxter SW, Choong DY, Eccles DM, Campbell IG. Polymorphic variation in CYP19 and the risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2001; 22: 347–9.

Benet LZ, Sheiner LB. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, da distribuição e eliminação das drogas. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F. (eds.). 7.^a ed. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1987.

Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clinical Pharmacokinetics* 1995; 29: 192-209.

Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA Cancer J Clin* 1995; 45(5): 263-78.

Boyapati SM, Shu XO, Gao YT, Cai Q, Jin F, Zheng W. Polymorphisms in CYP1A1 and breast carcinoma risk in a population-based case-control study of Chinese women. *Cancer* 2005 Jun 1;103(11): 2228-35

Butlletí G. Reacciones adversas relacionadas con la metabolización de los fármacos. Pamplona, Butlletí Groc, Barcelona 1999; 12(3): 9-11.

Caporaso N. Selection of candidate genes for population studies. In: *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*. IARC Scientific publications. Lyons 1999;148: 23-36.

Cascorbi I, Brockmöller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Research* 1996; 56: 4965-4969.

Chacko P, Joseph T, Mathew BS, Rajan B, Pillai MR. Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome. *Mutat Res* 2005 Mar 7; 581(1-2): 153-63.

Chen S, Besman MJ, Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Mohandas T, et al. Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA* 1988; 7: 27-38.

Collins JA, Blake JM, Crosignani PG. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Human Reprod. Update* 2005; 11(6): 545-560.

Crespi CL, Penman B, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P-450s including the polymorphic human cytochrome P-4502D6. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1197-1201.

Crofts F, Cosma GN, Currie D, Taioli E, Toniolo P, Garte SJ. A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1729-1731.

Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, *et al.* Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2961-2963.

Crum CP. Trato genital e mama femininos. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional*. 5^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.936-1002.

Da Fonte de Amorim L, Rossini A, Mendonca G, Lotsch P, de Almeida Simao T, de Moura Gallo C, et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Câncer Lett* 2002; 181:179–86.

Da Silva JLF, Amadei LPP. Tratamento radioterápico do câncer de mama. In: Guimarães JRQ. *Manual de Oncologia*. 2^a ed. São Paulo: BBS Editora; 2006. p.571-584.

De Jong MM, Nolte IM, Te Meerman GJ, Van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 2002; 39(4): 225-42.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 208-21.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, Teare MD, Ponder BAJ, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999; 8: 843-854.

Eklund GW, Amaral BB. O que é melhor pra o diagnóstico precoce do câncer de mama: mamografia ou ecografia mamária? Qual é a frequência para o uso da mamografia como método de rastreamento? In: Boff RA e Wisintainer F. O que as mulheres querem saber sobre câncer de mama. As 100 perguntas mais frequentes. 3ª ed. Caxias do Sul: Mesa-Redonda; 2005. p.76-80.

Eubanks M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 50-56.

Feigelson HS, Ross RK, Yu MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Henderson BE. Genetic susceptibility to cancer from exogenous and endogenous exposures. *J Cell Biochem Suppl* 1996; 25: 15-22.

Garte SJ. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1329-1332.

Gil, AR. Qual a incidência de câncer de mama no Brasil e no mundo? É verdade que esse número está aumentando? Por quê? A mortalidade continua alta? In: Boff RA e Wisintainer F. O que as mulheres querem saber sobre câncer de mama. As 100 perguntas mais frequentes. 3ª ed. Caxias do Sul: Mesa-Redonda; 2005. p.33-34.

Gilliland FD. Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? *Environ. Health Perspect* 1997; 105: 897-900.

Gough AC, Smith CAD, Howell SM, Wolf CR, Bryant SP, Spurr NK. Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* 1993; 15: 430-432.

Guenguerich FP. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 2000; 21: 345-351.

Guimarães JRQ, Guimarães MMQ, de Paula Filho U. Detecção precoce dos cânceres ginecológico e mamário. In: Guimarães JRQ. Manual de Oncologia. 2^a ed. São Paulo: BBS Editora; 2006. p.613-616.

Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, De Vivo I, Colditz GA, Willett WC, et al. A tetranucleotide repeat polymorphism in CYP19 and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2000; 87: 204–10.

Hatagima A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. *Cad Saúde Pública* 2002; Rio de Janeiro, 18(2): 357-377.

Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic polymorphisms of the lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450A1 gene. *Journal of Biochemistry* 1991; 110: 407-411.

Healey CS, Dunning AM, Durocher F, Teare D, Pharoah PD, Luben, RN, Easton DF, Ponder BA. Polymorphisms in the human aromatase cytochrome P450 gene (CYP19) and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2000; 21(2): 189-193.

Hildebrand CE, Gonzalez FJ, McBride OW, Nebert DW. Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 gene to chromosome 15. *Nucleic Acids Research* 1985; 13: 2009-2016.

Honkakoski P, Negishi M. The structure, function and regulation of cytochrome P450 2A enzymes. *Drug Metab Rev* 1997; 29: 977-996.

Huang CS, Shen CY, Chang KJ, Hsu SM, Chern HD. Cytochrome P4501A1 polymorphism as a susceptibility factor for breast cancer in postmenopausal Chinese women in Taiwan. *Br J Cancer* 1999; 80: 1838–43.

Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 1998; 58: 4023-4037.

Idle J. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat Res* 1991; 247: 259-266.

Idle JR, Mahgoub A, Lancaster R, Smith RL. Hypotensive response to debrisoquine and hydroxylation phenotype. *Life Sci* 1978 Mar; 22(11): 979-83.

INCA: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: Novembro de 2007.

Ishibe N, Hankinson SE, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Speizer FE, et al. Cigarette smoking, cytochrome P450 1A1 polymorphisms, and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Cancer Res* 1998; 58: 667–71.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(4): 259.

Kato S, Shields G, Caporaso N, Sugimura H, Trivers GE, Tucker MA, *et al.* Analysis of cytochrome p450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997; 3: 515-518.

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Critical Reviews in Hematologic Oncology* 1993; 14: 77-87.

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Letters* 1990; 263: 131-133.

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic *CYP2D6* gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 889-904.

Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*. 1999 Mar 1; 93(5): 1496-501.

Krajinovic M, Ghadirian P, Richer C, Sinnett H, Gandini S, Perret C, et al. Genetic susceptibility to breast cancer in French- Canadians: role of carcinogen-metabolizing enzymes and gene–environment interactions. *Int J Cancer* 2001; 92: 220–5.

Kristensen VN, Anderson TI, Lindblom L, Erikstein B, Magnus P, Børresen-Dale AL. A Rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 43–48.

Kristensen VN, Borresen-Dale AL. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutat Res* 2000; 462: 323–333.

Laden F, Ishibe N, Hankinson SE, Wolff MS, Gertig DM, Hunter DJ, et al. Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1, and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1560–5.

Ladona MG, Abildúa RE, Ladero JM, Román JM, Plaza MA, Agúndez JA, *et al.* CYP2D6 genotypes in Spanish women with breast cancer. *Cancer Lett* 1996 Jan 19; 99(1): 23-8.

Lewis BJ, Conry RM. Câncer de mama. In: Benett JC, Plum F. *Tratado de medicina interna*. 20ª ed, v. 2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.1461-66.

Li Y, Millikan RC, Bell DA, Cui L, Tse CJ, Newman B, *et al.* Cigarette smoking, cytochrome p4501A1 polymorphisms, and breast cancer among African-American and white women. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 460-473.

Linhares JJ, da Silva IDC, de Souza NCN, Noronha EC, Ferraro O, Baracat FF. Polymorphism in genes of the progesterone receptor (PROGINS) in women with breast cancer. A case-control study. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 8: 27.

Llama EF, Avendaño C. Principios de farmacocinética y metabolismo de fármacos. In: Avendaño C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. Madrid: Interamericana-McGraw Hill; 1993.

Masson LF, Sharp L, Cotton SC, Little J. Cytochrome P-450 1A1 gene polymorphisms and risk of breast cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005 May 15;161(10): 901-15.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000;321:624-8

Mendelson CR, Means GD, Mahendroo MS, Corbin CJ, Steinkampf MP, Graham-Lorence S, et al. Use of molecular probes to study regulation of aromatase cytochrome P-450. *Biol Reprod* 1990; 42: 1–10.

Mendonça FF, Urata YN, Buosi TB, Kowalski LP, Rainho CA, Rogatto SR. Genotipagem dos genes CYP1A1, CYP1A2, GSTM1 e GSTT1 em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Resumos do 49º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SBG, 2003. 1 CD-ROM.

Meyer U. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996; 24: 449-459.

Mitrunen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res* 2003; 544: 9–41.

Miyoshi Y, Takahashi Y, Egawa C, Noguchi S. Breast cancer risk associated with CYP1A1 genetic polymorphisms in Japanese women. *Breast J* 2002; 8: 209–15.

Moysich KB, Shields PG, Freudenheim JL, Schisterman EF, Vena JE, Kostyniak P, et al. Polychlorinated biphenyls, cytochrome P4501A1 polymorphism, and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 41–4.

Nebert DW, Mckinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 273-280.

Nebert DW. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat Res* 1991; 247: 267-281.

Nussbaum, RL, McInnes RR, Willard HF. In: Thompson e Thompson *Genética Médica*. 6^a ed, Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 2002. p.276-293.

O'Neill JS, Elton RA, MillerWR. Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296: 741–3.

Park SK, Kang D, Noh DY, Lee KM, Kim SU, Choi JY, et al. Reproductive factors, glutathione S transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78: 89-96.

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37: 4-66.

Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett e Doull's *Toxicology. The Basic Science of Poisons* (C. D. Klaassen, ed.) 5^a ed. New York/Saint Louis/San Francisco: McGraw-Hill. 1996; 6: 113-186.

Perera FP. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 496-509.

Peters WHM, Kremers PG. Cytochromes P450 in the intestinal mucosa of man. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1.535-1.538.

Pharoah PDP, Dunning AM, Ponder PAJ, Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 850-860.

Pinotti M. A amamentação protege contra o de câncer de mama? E o número de filhos? In: Boff RA e Wisintainer F. O que as mulheres querem saber sobre câncer de mama. As 100 perguntas mais freqüentes. 3ª ed. Caxias do Sul: Mesa-Redonda; 2005. p.50.

Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human aromatase cytochrome P-450 gene (*CYP19*). *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 195.

Probst-Hensch NM, Ingles SA, Diep AT, Haile RW, Stanczyk FZ, Kolonel LN, et al. Aromatase and breast cancer susceptibility. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6: 165–173.

Rebbeck TR, Rosvold EA, Duggan DJ, Zhang J, Buetow KH. Genetics of CYP1A1: coamplification of specific alleles by polymerase chain reaction and association with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 511-14.

Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphisms of drug metabolism. In: Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ. (eds.). *Applied Pharmacokinetics: principles of therapeutic drug monitoring*. Vancouver: Applied Therapeutics; 1992.

Ribeiro FS, de Amorim LM, de Almeida Simão T, Mendonça GA, de Moura Gallo CV, Pinto LF. CYP19 (TTTA)_n polymorphism and breast cancer risk in Brazilian women. *Toxicol Lett* 2006; 164(1): 90-5.

Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: Allele frequencies and phenotypic consequences. *American Journal of Human Genetics* 1997; 60: 284-295.

Shi CY, Seow A, Lin Y, Chia KS, Ong CN, Chan SH, et al. Biomarkers: a molecular approach to cancer epidemiology. *Ann Acad Med Singapore* 1996; 25: 49-54.

Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 2004; 95(1): 1-6.

Shin A, Kang D, Choi JY, Lee KM, Park SK, Noh DY, et al. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms and breast cancer risk in Korean women. *Exp Mol Med*. 2007 Jun 30; 39(3): 361-6.

Siegelmann-Danieli N, Buetow KH. Constitutional genetic variation at the human aromatase gene (CYP19) and breast cancer risk. *Br J Cancer* 1999; 79: 456–63.

Silva AS, Ropelatto C, Filippini CAF, Bianchini E, Bagatinil F, Brocardo GA, et al. Ocorrência de câncer de mama no Brasil e no Estado de Santa Catarina. *NewsLab* 2002; 98: 100.

Smith CA, Moss JE, Gough AC, Spurr NK, Wolf CR. Molecular genetic analysis of the cytochrome P450-debrisoquine hydroxylase locus and association with cancer susceptibility. *Environ Health Perspect* 1992; 98: 107–12.

Sparkes RS, Mohandas T, Chen S, Besman MJ, Zollman S, Shively JE. Assignment of the aromatase gene to human chromosome 15q21. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 46: 696-697.

Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, *et al*. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999; 20(11): 2125-9.

Stüven T, Griesse EU, Kroemer HK, Eichelbaum M, Zanger UM. Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance- and multiplex polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 1996; 6(5): 417-21.

Taioli E, Trachman J, Chen X, Toniolo P, Garte SJ. A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African–American women. *Cancer Res* 1995; 55: 3757–8.

Toda K, Merashima M, Kawamoto T, Sumimoto H, Yokoyama Y, Kuribayashi I, *et al*. Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Europ J Biochem* 1990; 193: 559-565.

Topić E, Stefanović M, Ivanisević AM, Petrinović R, Curčić I. The cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) gene polymorphism among breast and head and neck cancer patients. Clin Chim Acta 2000; 296(1-2): 101-9.

Vaury C, Laine R, Noguiez P, De Coppet P, Jaulin C, Praz F, *et al.* Human glutathione S-transferase CYP1A1*2A null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. Cancer Res 1995; 55: 5520-5523.

Watkins PB, Wrigton SA, Schuetz EG, Molowa DT, Guzelian PS. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P450 in the intestinal mucosa of rats and man. J Clin Invest 1987; 80: 1029-1036.

Watkins PB. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. Gastroenterology Clin North Am 1992; 21: 511-526.

Weinberg RA. The integrations of molecular genetics into cancer management. Cancer 1992; 70: 1653-1658.

Wolf CR, Smith CA, Gough AC, Moss JE, Vallis KA, Howard G, *et al.* Relationship between the debrisoquine hydroxylase polymorphism and cancer susceptibility. Carcinogenesis 1993; 13: 1035-8.

8- ANEXOS

ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

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

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 26/07/05.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 365/2005
CAAE: 0163.0.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS M1 E M2 NO GENE CYP1A1, G1934A E A2637DEL NO GENE CYP2D6 E [TTTA]N NO GENE CYP19 EM UMA AMOSTRA DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lidiane Camila Rueda

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica - FCM UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/07/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/07/06

II - OBJETIVOS

Avaliar, em uma população de portadores de câncer de mama onde as mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 já foram analisadas, investigar a presença de (a) mutações m1 e m2 no gene CYP1A1, (b) mutação G1934A e A2637del no gene CYP2D6 e (c) a mutação [TTTA]n no gene CYP19. A presença destas mutações será correlacionada com o grau histológico dos tumores e a apresentação clínica da doença, além de correlacioná-las com possíveis mutações nos genes BRCA1 e BRCA2.

III - SUMÁRIO

Estudo observacional, prospectivo e analítico, que analisará 200 indivíduos divididos em 2 grupos (1) pacientes portadores de câncer de mama sem histórico familiar e (2) indivíduos sem diagnóstico de câncer de mama e sem histórico familiar. A avaliação destas novas mutações parte do racional de que vários genes estão envolvidos na susceptibilidade de desenvolver câncer de mama e que polimorfismos que afetariam o metabolismo de drogas poderia ser um deles, uma vez que permitiriam a maior exposição a fármacos com efeito mutagênico. Destes genes, os genes CYP1A1, CYP2D6 E CYP19, associados ao metabolismo do citocromo p450 já foram analisados em algumas populações, e mostraram associação positiva com câncer de mama. Na população alvo deste estudo, a frequência destas mutações não é conhecida, nem a possível associação com ca de mama e/ou mutações dos genes BRCA1 e BRCA2. Para testar esta hipótese, o pesquisador utilizará material (amostras de DNA) coletadas de pacientes de projeto anterior (onde as mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 estarão sendo analisadas em paralelo) e que se encontram estocadas sob responsabilidade do orientador deste projeto. Todas as mutações serão analisadas através de reação em cadeia de polimerase, utilizando primers específicos. Os critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos de pesquisa são definidos no texto, e os dados coletados dos prontuários médicos serão utilizados baseados no estudo anterior.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de estudo complementar a estudo anterior, visando analisar novas mutações e sua relação com a susceptibilidade ao câncer de mama. Como serão utilizadas amostras previamente coletadas e estocadas sob responsabilidade do orientador do projeto, o pesquisador solicita dispensa de termo de consentimento. A metodologia é adequada, e o pesquisador compromete-se a manter o sigilo sobre os sujeitos de pesquisa, além de garantir a divulgação dos resultados. Trata-se de projeto de mestrado, com orçamento previsto de R\$50.000,00, mas não há referência de solicitação de auxílio pesquisa para execução do mesmo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

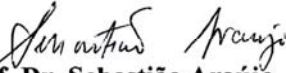
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2005.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “Avaliação de polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP19* em uma amostra de pacientes com câncer de mama esporádico”

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com Câncer de Mama. O objetivo geral do estudo é o de procurar portadores de polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP19*, que podem contribuir para o quadro clínico de câncer de mama. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será colhida uma amostra de sangue venoso (30 mL, o equivalente a dez colheres de sopa). Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 30 mL de sangue venoso será efetuada. 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.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético para esta mutação. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Qualquer dúvida ou informação poderá contatar a UNICAMP no tel. (019) 3521-8907 (Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3521-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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 recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____ 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 e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG participante (ou responsável)

Data

Assinatura do participante (ou responsável)

Data

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.

Nome e RG do pesquisador _____

_____	_____
Assinatura do pesquisador	Data

ANEXO 3



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Departamento de Genética Médica

FICHA DE COLETA DE DADOS

Título do projeto: “Avaliação de polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP19* em uma amostra de pacientes com câncer de mama esporádico”

Dados pessoais:

Número do caso: _____ Matrícula (HC): _____

Nome: _____ Fone: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Nacionalidade: _____ Origem étnica: _____

Data de nascimento: _____

Data da entrevista: _____

Informações clínicas pessoais:

CARCINOMA DE MAMA: () SIM () NÃO

CARCINOMA BILATERAL: () SIM () NÃO

Outro Carcinoma: () Sim () Não

() Ovário () Cólon () Próstata

() _____.

Possui filhos: () Sim () Não

Quantos? _____.

Idade da 1ª () e última gestação ().

Informações clínicas familiares:

Familiares com carcinoma de mama: () Sim () Não

Grau de parentesco:

1º grau: () mãe () pai () irmã () irmão () filha (o)

2º grau: () avô () avó () tio (a) () primo (a) () neto (a)

3º grau _____ Quantos? _____

Familiares com outro carcinoma: () Sim () Não

Qual? _____

Consanguinidade: Quem? _____

Heredograma:

Observações:

Lauda anátomo-patológico

Número do Exame I _____ I Emissão I_I_I_I_I_I_I

Exame microscópico:

Tipo histológico predominante () Ca ductal *in situ* () Ca lobular *in situ* () Doença de Paget do mamilo sem tumor associado () Ca ductal invasivo () Ca ductal invasivo com componente intraductal predominante () Ca lobular invasivo () Ca tubular () Ca mucoso(colóide) () Ca medular () Ca papilífero () Ca inflamatório

() Outro _____

Subtipo histológico do carcinoma intraductal () Comedo () Cribiforme () Intracístico

() Micropapilífero () Sólido () Papilífero () Aderente *clinging*

() Não avaliável

() Outro _____

Gradação (do carcinoma invasivo e *in situ*)

() Grau 1 () Grau 2 () Grau 3 () Não aplicável

Lauda imunoistoquímico:

Número do Exame I _____ I Emissão I_I_I_I_I_I_I

Receptores estrogênicos () Positivo () Negativo

Expressão da proteína c-erb-B2 () Positivo () Negativo

Observações: _____

ANEXO 4

Lista de Resultados dos Controles

NUMGENET	IDADE	CYP1A1		CYP2D6		CYP19	
		m1	m2	*3	*4	alelo 1	alelo 2
0001/04	35	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto	173	189
0002/04	27	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	189
0881/04	55	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
1053/04	22	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1054/04	21	Normal	Normal	Normal	Normal	170	185
1055/04	46	Normal	Normal	Normal	Normal	170	185
1090/03	49	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1097/03	56	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
1098/03	37		Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	170	170
1099/03	39	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1100/03	47	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1101/03	30	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
1102/03	46	Normal	Heterozigoto	Normal	Normal		
1108/03	36	Normal	Normal	Heterozigoto	Normal	170	173
1113/03	43		Normal	Normal	Normal		
1116/03	23	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal	173	193
1118/03	23	Homozigoto Mutante	Homozigoto Mutante	Normal	Normal		
1120/03	42		Normal	Normal	Normal	189	189
1122/03	23	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal		
1125/03	35		Heterozigoto	Normal	Normal	170	189
1128/03	58	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Heterozigoto	173	173
1129/03	41	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	173	189
1132/03	45	Normal	Heterozigoto	Normal	Normal	170	170
1133/03	51	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1135/03	56		Normal	Normal	Heterozigoto		
1136/03	52	Normal	Normal	Normal	Normal		

NUMGENET	IDADE	CYP1A1		CYP2D6		CYP19	
		m1	m2	*3	*4	alelo 1	alelo 2
1137/03	30	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
1139/03	42	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
1140/03	39		Normal	Heterozigoto	Normal	170	189
1141/03	24	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1142/03	27		Normal	Normal	Normal	177	177
1153/03	33		Normal	Normal	Normal	173	173
1155/03	28	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
1164/03	27		Normal	Normal	Normal	170	177
1166/03	57		Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1521/03	63	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal		
1530/03	58	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
1532/03	42	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	173
1536/03	23	Normal	Normal	Normal	Normal	170	189
1538/03	40		Heterozigoto	Normal	Heterozigoto		
1541/03	41	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1542/03	57	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal		
1545/03	51	Normal	Normal	Normal	Normal	173	177
1547/03	47	Homozigoto Mutante	Normal	Normal	Normal	170	170
1548/03	61	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
1550/03	40	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	189	193
1552/03	100	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Homozigoto Mutante	189	189
1565/03	48	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1566/03	37	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	173	189
1567/03	27	Normal	Normal	Normal	Normal		
1568/03	44	Homozigoto Mutante	Normal	Normal	Heterozigoto	173	177
1571/03	45	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	173	173
1572/03	61	Normal	Normal	Normal	Normal	173	177
1653/03	47	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189

NUMGENET	IDADE	CYP1A1		CYP2D6		CYP19	
		m1	m2	*3	*4	alelo 1	alelo 2
1654/03	47	Normal	Normal	Normal	Normal	170	177
1656/03	42	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal	170	170
1657/03	45	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	170	173
1658/03	36	Homozigoto Mutante	Normal	Normal	Homozigoto Mutante	170	189
1665/03	50	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	173	189
1666/03	41	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
1667/03	53	Normal	Normal	Normal	Normal	170	173
1668/03	52	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal	170	189
1673/03	51	Normal	Normal	Normal	Normal	170	173
1674/03	62	Homozigoto Mutante	Homozigoto Mutante	Normal	Normal	170	173
1676/03	44	Normal	Normal	Normal	Normal	170	189
1677/03	45	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	170	189
1678/03	55	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
1679/03	52	Normal	Normal	Normal	Normal	189	189
1680/03	48	Normal	Normal	Normal	Normal	177	189
1699/03	52	Normal	Normal	Normal	Normal	177	189
1700/03	45	Normal	Normal	Normal	Normal	170	173
1701/03	76	Normal	Normal	Heterozigoto	Normal	170	177
1727/03	39	Heterozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	170	170
1728/03	44	Normal	Normal	Normal	Normal	173	177
1729/03	61	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1730/03	53	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	193
1731/03	45	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	189
1732/03	32	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1734/03	69	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	170	177
1735/03	67	Normal	Normal	Normal	Normal		
1736/03	31	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	189	189
1743/03	59	Normal	Normal	Normal	Normal		

NUMGENET	IDADE	CYP1A1		CYP2D6		CYP19	
		m1	m2	*3	*4	alelo 1	alelo 2
1744/03	42	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	177	189
1745/03	42	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	170	173
1750/03	65	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	170	173
1751/03	49	Normal	Normal	Normal	Normal	170	173
1752/03	22	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
1753/03	47	Normal	Normal	Normal	Normal	173	185
1754/03	22	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Heterozigoto		
1755/03	41	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1756/03	43	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	173	177
1758/03	41	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	173
1759/03	74	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal	173	177
1762/03	38	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	189	189
1763/03	43	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1764/03	49	Normal	Normal	Normal	Normal	189	189
1766/03	38	Normal	Normal	Normal	Normal	173	181
1767/03	39	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	189
1768/03	42	Normal	Normal	Normal	Normal	189	189
1769/03	42	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	193
1770/03	40	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto	173	189
1771/03	33	Homozigoto Mutante	Heterozigoto	Normal	Normal	185	189
1772/03	41	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	189	193
1774/03	42	Normal	Normal	Normal	Normal		
1775/03	39	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal		
1776/03	42	Normal	Normal	Normal	Normal	170	173
1795/03	25	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1802/03	50	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	189
1803/03	42	Normal	Normal	Normal	Normal		
1805/03	53	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	189
1809/03	42	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	173	173

NUMGENET	IDADE	CYP1A1		CYP2D6		CYP19	
		m1	m2	*3	*4	alelo 1	alelo 2
1912/03	32	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
1913/03	0		Normal	Normal	Heterozigoto	170	177
1914/03	0	Normal	Normal	Normal	Normal		
1922/03	29	Normal	Normal	Normal	Normal		
1924/03	35	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	173
1926/03	29	Normal	Normal	Normal	Normal	170	177
1928/03	22	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto		
1929/03	21	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto		
1934/03	29	Normal	Normal	Normal	Normal		

ANEXO 5

Legenda das tabelas

NUMGENET = Número do indivíduo;

IDADE = Idade do Indivíduo;

IDADIAG = Idade do diagnóstico do carcinoma da mama;

CARCIBI = Carcinoma bilateral;

TIPOHIST = Tipo histológico do carcinoma de mama;

SUBINTRA = Subtipo histológico do carcinoma intraductal;

GRADAÇ = Gradação (do carcinoma invasivo);

RE = Receptor de estrógeno;

RP = Receptor de progesterona;

Tipo histológico:

(0) Sem carcinoma; (1) Ca ductal *in situ*; (2) Ca lobular *in situ*; (3) Doença de Paget do mamilo sem tumor associado; (4) Ca ductal invasivo; (5) Ca ductal invasivo com componente intraductal predominante; (6) Ca lobular invasivo; (7) Ca tubular; (8) Ca mucoso(colóide); (9) Ca medular; (10) Ca papilífero; (11) Ca inflamatório; (12) Outro.

Subtipo histológico do carcinoma intraductal:

(1) Comedo; (2) Cribiforme; (3) Intracístico; (4) Micropapilífero; (5) Sólido; (6) Papilífero;
(7) Aderente *clinging*; (8) Não avaliável. (9) Outro.

Gradação (do carcinoma invasivo e *in situ*):

(1) Grau 1; (2) Grau 2; (3) Grau 3; (4) Não aplicável.

Receptores estrogênicos:

(1) Positivo; (2) Negativo; (3) ca bilateral mais em uma mama que na outra.

ANEXO 6

Lista de Resultados dos Pacientes com Câncer de Mama

NUNGENET	IDADIAG	CARCINBI	TIPOHIST	SUBINTRA	GRADAC	RE	RP	CYP1A1		CYP2D6		CYP19	
								m1	m2	*3	*4	ALELO1	ALELO2
0142/04	55	N	1	9	3	0	0	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	177	189
0322/04	52	N	1	1	3	0	0	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	170	189
0329/04	50	N	4	8	2	2	2	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal		
0331/04	41	N	4	8	3	0	0	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal	173	173
0332/04	38	N	1	8	3	0	0	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal		
0368/04	45	N	4	4	3	1	1	Normal	Normal	Normal	Normal		
0425/04	37	N	4	8	5	1	1	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal		
0430/04	39	N	4	8	3	2	1	Normal	Normal	Normal	Normal	170	189
0431/04	45	N	4	8	2	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal		
0432/04	48	S	4	8	2	1	1	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	170	170
0444/04	29	N	4	1	3	1	1	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
0478/04	45	N	4	8	3	2	1	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	173	173
0519/04	31	N	4	8		1	1	Normal	Normal	Normal	Normal	177	189
0715/04	27	N	4	8	3	2	2	Normal	Normal	Normal	Normal	177	189
0720/04	43	N	4	8	3	2	2	Normal	Normal	Normal	Normal		
0721/04	26	N	4	8	2	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal		
0724/04	47	N	4	8	2	1	1	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Normal	170	189
0742/04	54	N	4	8	2	1	1	Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Heterozigoto	170	189
0743/04	49	N	4	8	2	1	1	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto		
0746/04	49	N	6					Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
0747/04	43	N	4	8	1	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	170	173
0748/04	29	N	4	8	2	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	170	185
0769/04	50	N	6	8	4	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
0772/04	49	N	9					Homozigoto Mutante	Heterozigoto	Normal	Normal	170	189

								<i>CYP1A1</i>		<i>CYP2D6</i>		<i>CYP19</i>	
NUNGENET	IDADIAG	CARCINBI	TIPOHIST	SUBINTRA	GRADAC	RE	RP	m1	m2	*3	*4	ALELO1	ALELO2
0835/04	40	N	1	8	3	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
0836/04	43	N	1	8	4	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	170	189
0837/04	40	N	1	8	3	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
1035/03	43	S	9	0	0	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	173	193
1036/03	46	S	4	0	0	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	170	177
1044/03	23	N	1	1	3	2	2	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1045/03	35	S	6	0	4	1	1	Normal	Normal	Normal	Normal	170	173
1050/03	19	N	12	0	0	0	0	Normal	Normal	Normal	Heterozigoto	173	185
1052/03	29	N	4	0	2	0	0	Heterozigoto	Normal	Normal	Normal	170	189
1077/03	44	N	4	0	0	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	170	170
1080/03	41	S	4	0	3	0	0		Heterozigoto	Heterozigoto	Normal		
1081/03	31	N	1	1	2	1	1	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto	170	170
1087/03	29	N	4	0	3	0	0	Normal	Heterozigoto	Normal	Normal	170	170
1091/03	51	N	6	0	4	1	1	Normal	Normal	Normal	Normal	177	189
1172/03	28	N	4		3			Heterozigoto	Heterozigoto	Normal	Heterozigoto	170	173
1533/03	47	N	10	8	4	0	0	Normal	Normal	Normal	Normal	173	189
1650/03	36	N	4		2	1	1	Heterozigoto	Normal	Heterozigoto	Normal		
1651/03	42	N	12		3			Normal	Normal	Normal	Normal		
1714/03	45	N	4	9	2	1	1	Heterozigoto	Normal	Normal	Heterozigoto	173	189

