

Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto



**Estudo dos polimorfismos CYP1B1 Val⁴³²Leu,
MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met como factores
de risco de cancro da mama em mulheres da Beira
Interior**

Luísa Maria Sousa Ribeiro Capitão

Porto, 2008

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

**Estudo dos polimorfismos CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR
Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met como factores de risco de
cancro da mama em mulheres da Beira Interior**

Orientador: Prof. Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro

Luísa Maria Sousa Ribeiro Capitão

Porto, 2008

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina e Oncologia
Molecular, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Agradecimentos

À Professora Doutora Luiza Granadeiro, orientadora deste trabalho, por toda a sua disponibilidade, atenção, motivação, estímulo e amizade, o meu mais sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor João Queiroz, Presidente da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, pelo acolhimento e cedência dos meios necessários e equipamentos fundamentais para a realização deste trabalho, OBRIGADO.

Ao Professor Doutor José Moutinho pelo apoio prestado na parte clínica deste trabalho e também pela sua simpatia e disponibilidade.

À Enfermeira Maria da Graça Veiga, por todo o trabalho de colheita de sangue, disponibilidade, amizade e carinho, o meu muito obrigado.

A todos os colegas do laboratório de investigação do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) pela amizade e companheirismo.

Agradeço ainda ao Prof. Doutor Júlio Carvalheira da Universidade do Porto por todo o apoio dado na análise estatística dos resultados.

À Rita, por partilhar as minhas tristezas e alegrias e por ser minha “irmã”.

Ao Hugo por todos estes anos de apoio, amizade, carinho, incentivo, por toda a alegria que me tem dado, sempre presente no meu coração.

Aos meus pais pelo sacrifício que fez por mim ao longo destes anos. Sem o seu carinho, suporte e encorajamento eu não poderia ter realizado este projecto. Assim por acreditarem em mim, esta é uma pequena retribuição.

Ao meu avô Fernando, por todo o carinho e força dados ao longo de toda a minha vida académica, o meu agradecimento com todas as minhas saudades ...

Lista de Abreviaturas

μg – Micrograma

μL – Microlitro

pmol – Picomol

Abs – Absorvência

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AMPc – Adenosina Monofosfato cíclico

BAX – Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

BbrPI – Enzima de restrição

bp – Pares de bases

BRCA1 - Gene de susceptibilidade do cancro da mama 1

BRCA2 - Gene de susceptibilidade do cancro da mama 2

CHCB – Centro Hospitalar da Cova da Beira

CICS - Centro de Investigação das Ciências da Saúde

COMT – Catecol-*O*-metiltransferase

CYP1B1 – Enzima 1B1 do citocromo P450

DdeI - Enzima de restrição

dNTP's – Desoxinucleosídeos trifosfato

DO – Densidade óptica observada

dp – Desvio padrão

Eco57 I - Enzima de restrição

EGF – Factor de crescimento epidérmico

FE – Fitoestrogénios

G1- Fase G1 da interfase do ciclo celular

Hinf I – Enzima de restrição

IC 95% - Intervalo de confiança a 95%

ILGF – Factor de crescimento semelhante à insulina

MCM – Mulheres com cancro da mama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – Minutos

mL – Mililitro

MS – Mulheres saudáveis

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase
NAT2 -Gene da N-acetiltransferase 2
Nla III - Enzima de restrição
NLS – Sequência de localização nuclear
°C – Graus celcius
OR - Odds Ratio
P - Valor de probabilidade
p21 – Proteína reguladora do ciclo celular
p53 – Gene supressor tumoral
PCR – Polymerase Chain Reaction
pRB – Gene supressor tumoral
RAD51 – Proteína
RE – Receptores de estrogénios
RE α - Receptor de estrogénios α
RE β - Receptor de estrogénios β
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorfism
RP – Receptores de progesterona
s – Segundos
SAM – S-adenosilmetionina
SNPs - Single nucleotide polymorphisms
TGF – Factor de crescimento tumoral
THS - Terapia hormonal de substituição

Índice

Resumo	xiv
Abstract	xvi
1 Introdução	1
1 O cancro	2
1.1 Factores de risco para o cancro da mama	2
1.1.1 Factores de risco associados ao metabolismo hormonal	3
1.1.2 Factores de risco não associados ao metabolismo hormonal	3
1.1.3 Factores genéticos	5
2 Os estrogénios e o cancro da mama	7
3 Polimorfismos em genes associados ao risco de desenvolver cancro da mama	13
3.1 Gene da CYP1B1	13
3.2 Gene da MTHFR	15
3.3 Gene da COMT	16
4 Os genes de susceptibilidade do cancro da mama BRCA1 e BRCA2	18
2 Objectivos	22
3 Materiais e Métodos	24
3.1 Material	25
3.1.1 Amostra populacional	25
3.1.2 Colheita das amostras de sangue	25
3.1.3 Reagentes usados na elaboração do trabalho experimental	26
3.1.4 Aparelhos usados na elaboração do trabalho experimental	26
3.2 Métodos	27
3.2.1 Extração de ADN das amostras de sangue total	27
3.2.2 Determinação da pureza e concentração do ADN	28
3.2.3 Determinação dos genótipos dos polimorfismos Val ⁴³² Leu do gene da CYP1B1, Ala ²²⁵ Val do gene da MTHFR e Val ¹⁵⁸ Met do gene da COMT por PCR-RFLP	28
3.2.3.1 Determinação do genótipo do polimorfismo Val ⁴³² Leu do gene da CYP1B1	29
3.2.3.1.1 Amplificação de ADN por PCR (Polymerase Chain Reaction)	29
3.2.3.1.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)	30
3.2.3.2 Determinação do genótipo do polimorfismo Ala ²²⁵ Val do Gene da MTHFR	31

3.2.3.2.1 Amplificação de ADN por PCR	31
3.2.3.2.2 RFLP	32
3.2.3.3 Determinação do genótipo do polimorfismo Val ¹⁵⁸ Met do Gene da COMT	33
3.2.3.3.1 Amplificação de ADN por PCR	33
3.2.3.3.2 RFLP	35
3.2.4 Análise do genótipo das mutações 185delAG, 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2, por PCR-RFLP	36
3.2.4.1 Amplificação de ADN por PCR	36
3.2.4.2 RFLP	38
3.2.6 Análise estatística	39
4 Apresentação e Discussão dos Resultados	41
4.1 Distribuição por frequências dos genótipos para a CYP1B1 Val⁴³²Leu	42
4.2 Distribuição por frequências dos genótipos para a MTHFR Ala²²⁵Val	47
4.3 Distribuição por frequências dos genótipos para a COMT Val¹⁵⁸Met	51
4.4. Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu versus idade	55
4.5. Distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val versus idade	59
4.6. Distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met versus idade	61
4.7 Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met versus história familiar na população de mulheres com cancro da mama	63
4.8 Distribuição por frequências para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met	64
4.9 Distribuição por frequências para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met versus idade	69
4.10 Distribuição por frequências para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met, simultaneamente	72
4.11 Distribuição por frequências para as mutações 185delAG, 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2	74
5 Conclusões e Perspectivas Futuras	75

Perspectivas futuras	76
6 Bibliografía	77
ANEXOS	88

Índice de Figuras

Figura nº1: Locais de síntese e de acção dos estrogénios nas mulheres pré e pós-menopáusicas, adaptado de Clemons e Goss, 2001. _____	8
Figura nº2: Via de metabolismo e mecanismo de acção dos estrogénios, adaptado de Yager e Davidson, 2006. _____	10
Figura nº3: Produtos resultantes da oxidação dos estrogénios, adaptado de Cavalieri <i>et al.</i> , 2000. _____	17
Figura nº4: Domínios funcionais e mutações fundadoras dos genes BRCA1 e BRCA2, adaptado de Thompson e Easton, 2004. _____	18
Figura nº5: Resultado da reacção de PCR do gene CYP1B1 em gel de agarose a 2%. 30	
Figura nº6: Resultado do PCR-RFLP para o gene CYP1B1 em gel de agarose a 2%. 31	
Figura nº7: Resultado da reacção de PCR do gene MTHFR em gel de agarose a 2%. 32	
Figura nº8: Resultado do PCR-RFLP para o gene MTHFR em gel de agarose a 5%. _ 33	
Figura nº9: Resultado da reacção de PCR do gene COMT em gel de agarose a 2%. _ 34	
Figura nº10: Resultado do PCR-RFLP para o gene COMT em gel de agarose a 5%. _ 35	
Figura nº11: Resultado da reacção de PCR para os genes BRCA1 e BRCA2 em gel de agarose a 2%. _____	37
Figura nº12: Resultado do PCR-RFLP para os genes BRCA1 e BRCA2 em gel de agarose a 5%. _____	39

Índice de Gráficos

- Gráfico nº1: Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade inferior a 50 anos. _____ 56
- Gráfico nº2: Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade superior a 50 anos. _____ 57
- Gráfico nº3: Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama. _ 58
- Gráfico nº4: Distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade inferior a 50 anos. _____ 59
- Gráfico nº5: Distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade superior a 50 anos. _____ 60
- Gráfico nº6: Distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade inferior a 50 anos. _____ 61
- Gráfico nº7: Distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade superior a 50 anos. _____ 62
- Gráfico nº8: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e LL para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama. _____ 65
- Gráfico nº9: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e HL para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama. _____ 66
- Gráfico nº10: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e CT para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama. _____ 68

Gráfico nº11: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e CT para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade inferior a 50 anos. _____ 70

Gráfico nº12: Distribuição por frequências dos genótipos CT para MTHFR Ala²²⁵Val e HL para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade superior a 50 anos. _____ 71

Gráfico nº13: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu, CT para MTHFR Ala²²⁵Val e HL para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama. _____ 72

Índice de Tabelas

Tabela nº1: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN do gene da CYP1B1. _____	29
Tabela nº2: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene da CYP1B1. _____	29
Tabela nº3: Composição da reacção de digestão usando a enzima de restrição Eco57I, para determinação do genótipo do gene da CYP1B1. _____	30
Tabela nº4: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN do gene da MTHFR. _____	31
Tabela nº5: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene da MTHFR. _____	32
Tabela nº6: Composição da reacção de digestão usando a enzima de restrição HinfI, para determinação do genótipo do gene da MTHFR. _____	33
Tabela nº7: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN do gene da COMT. _____	34
Tabela nº8: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene da COMT. _____	34
Tabela nº9: Composição da reacção de digestão usando a enzima de restrição NlaIII, para determinação do genótipo do gene da COMT. _____	35
Tabela nº10: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN para as 3 mutações estudadas nos genes de susceptibilidade do cancro da mama (BRCA1/2). _	36
Tabela nº11: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene BRCA1 e BRCA2 correspondentes às mutações 185delAG e 6174delT, respectivamente. _____	37
Tabela nº12: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene BRCA1 correspondente à mutação 5382insC. _____	37

Tabela nº13: Composição de cada reacção de digestão usando a enzima de restrição específica para determinação da presença das mutações em estudo nos genes BRCA1/2.	38
<hr/>	
Tabela nº14: Distribuição por genótipo das mulheres que integraram o estudo.	40
Tabela nº15: População de mulheres com cancro da mama vs População saudável: distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val ⁴³² Leu.	43
Tabela nº16: Distribuição por frequências dos alelos V e L dos genótipos para CYP1B1 Val ⁴³² Leu.	45
Tabela nº17: Distribuição por genótipo para CYP1B1 Val ⁴³² Leu nas mulheres da população MS e MCM, na geração inicial e geração seguinte.	46
Tabela nº18: População de mulheres com cancro da mama vs População saudável: distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala ²²⁵ Val.	48
Tabela nº19: Distribuição por frequências dos alelos C e T dos genótipos para MTHFR Ala ²²⁵ Val.	49
Tabela nº20: Distribuição por genótipo para MTHFR Ala ²²⁵ Val nas mulheres da população MS e MCM, na geração inicial e geração seguinte.	50
Tabela nº21: População de mulheres com cancro da mama vs População saudável: distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val ¹⁵⁸ Met.	52
Tabela nº22: Distribuição por frequências dos alelos H e L dos genótipos para COMT Val ¹⁵⁸ Met.	53
Tabela nº23: Distribuição por genótipo para COMT Val ¹⁵⁸ Met nas mulheres da população MS e MCM, na geração inicial e geração seguinte.	54
Tabela nº24: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama: distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val ⁴³² Leu para idade inferior a 50 anos.	55
Tabela nº25: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama: distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val ⁴³² Leu para idade superior a 50 anos.	57

Tabela nº26: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val ⁴³² Leu e LL para COMT Val ¹⁵⁸ Met. _____	64
Tabela nº27: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val ⁴³² Leu e HL para COMT Val ¹⁵⁸ Met. _____	66
Tabela nº28: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val ⁴³² Leu e CT para MTHFR Ala ²²⁵ Val. _____	67
Tabela nº29: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val ⁴³² Leu e CT para MTHFR Ala ²²⁵ Val para idade inferior a 50 anos. _____	69
Tabela nº30: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos CT para MTHFR Ala ²²⁵ Val e HL para COMT Val ¹⁵⁸ Met para idade superior a 50 anos. _____	70
Tabela nº31: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val ⁴³² Leu, CT para MTHFR Ala ²²⁵ Val e HL para COMT Val ¹⁵⁸ Met. _____	72
Tabela nº32: Local de corte das enzimas de restrição usadas para digestão dos fragmentos de ADN amplificados. _____	89

Resumo

Em Portugal, o cancro da mama é uma das neoplasias mais comuns na mulher. É uma doença complexa e multifactorial em que existe uma forte influência de factores genéticos e ambientais. Nos últimos anos, os trabalhos científicos têm procurado identificar os factores de risco para o cancro, bem como factores que permitam melhorar a eficácia terapêutica.

Muitos processos neoplásicos têm na sua origem a expressão alterada de alguns genes. O BRCA1 e BRCA2 foram, até ao momento, os principais genes identificados para a susceptibilidade ao cancro da mama, no entanto, as mutações encontradas nestes genes só conseguem explicar uma pequena percentagem de todos os cancros da mama. Nos últimos anos, os dados experimentais sugerem que os estrogénios podem aumentar o risco para o cancro da mama. Uma vez que a exposição a estrogénios endógenos e/ ou exógenos é um factor de risco, pode-se considerar que os polimorfismos genéticos que afectam a expressão ou a actividade de produtos de genes envolvidos no metabolismo dos estrogénios e substâncias carcinogénicas podem constituir um factor de risco para o cancro da mama. Neste trabalho estudaram-se 3 polimorfismos: o polimorfismo CYP1B1 Val⁴³²Leu que consiste na transversão de um G por C no exão 3 do gene da CYP1B1 resultando na substituição de uma valina por uma leucina no codão 432, o polimorfismo MTHFR Ala²²⁵Val que consiste na substituição de uma alanina por uma valina no domínio N-catalítico do gene e o polimorfismo COMT Val¹⁵⁸Met que consiste na substituição de uma metionina por uma valina na posição 158 da COMT ligada à membrana e na posição 108 da COMT solúvel. Além destes polimorfismos analisou-se também a prevalência das mutações 185delAG e 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2.

Este trabalho tem como base um estudo do tipo caso-controlo, com o objectivo de estudar se os polimorfismos CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met constituem factor de risco para a doença em mulheres da Beira Interior.

Foram analisadas amostras de ADN de 62 mulheres, das quais 30 eram saudáveis e 32 tinham cancro da mama. A determinação dos genótipos correspondentes aos 3

polimorfismos e mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 estudados foi realizada recorrendo à metodologia de PCR-RFLP.

Os resultados obtidos, relativamente ao polimorfismo CYP1B1 Val⁴³²Leu, sugerem que as mulheres portadoras do genótipo VV têm maior risco para o cancro da mama (OR=0,1084; IC 95% 0,0124-0,9466), enquanto que as mulheres portadoras do genótipo VL têm menor risco (OR=8,0000; IC 95% 2,2197-28,8327).

A análise simultânea para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met parece indicar que as mulheres com genótipos heterozigóticos têm um menor risco para a doença.

O estudo demonstrou também que estas diferenças parecem ser mais significativas para as mulheres pré-menopáusicas.

Existe desequilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo COMT Val¹⁵⁸Met nas mulheres da Beira Interior estudadas.

Abstract

Breast cancer is one of the most common malignant tumours in Portuguese women. It's a complex and multifactorial disease where there is a strong interplay between genetic and environmental factors. In the last years, scientific researches have been trying to identify risk factors for cancer, as well as factors that will help to improve treatments.

The altered expression of some genes is a consequence for the initiation of many tumours. At present, BRCA1 and BRCA2 are the major susceptibility genes that have been identified for breast cancer however; the mutations found in these genes can only explain a small percent of all breast tumours. Experimental data suggests that estrogens can increase the risk for developing breast cancer. Since exposure to endogenous and/ or exogenous estrogens it's a risk factor, it can be considered that genetic polymorphisms that affect the expression or activity of the products of genes involved in the metabolism of estrogens and carcinogens may be a risk factor for breast cancer. We studied three polymorphisms: CYP1B1 Val⁴³²Leu consisting in G to C transversion at exon 3 was reported to result in valine to leucine substitution in codon 432, the MTHFR Ala²²⁵Val codes for an alanine to valine substitution in the N-terminal catalytic domain and COMT Val¹⁵⁸Met which results in a valine to methionine substitution at codon 108/ 158 of the cytosolic/ membrane-bound form of the protein. We also analyzed the prevalence of 185delAG and 5382insC mutations in BRCA1 and 6174delT mutation in BRCA2.

This work is based on a case-control study, with the aim of studying whether polymorphisms CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val and COMT Val¹⁵⁸Met constitute a risk factor for the disease in women of Beira Interior.

We analyzed DNA samples from 62 women, of whom 30 were healthy women and 32 had breast cancer. Determinations of the genotypes corresponding to the polymorphisms and BRCA1/ BRCA2 mutations studied were performed using a PCR-RFLP based assay.

The results, for the polymorphism CYP1B1 Val⁴³²Leu, suggest that women carrying the VV genotype have a higher risk for cancer breast (OR = 0.1084; 95% 0.0124-0.9466),

while women carrying VL genotype have a lower risk (OR = 8.0000; 95% 2.2197-28.8327).

The simultaneous analysis for CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val and COMT Val¹⁵⁸Met suggests that women with heterozygous genotypes have a lower risk for the disease.

The study also demonstrated that these differences appear to be more significant for premenopausal women.

There is imbalance of Hardy-Weinberg equilibrium for the COMT Val¹⁵⁸Met polymorphism in women of Beira Interior studied.

1 Introdução

1 O cancro

O cancro é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos e em muitos países europeus o cancro é a segunda causa de morte logo a seguir às doenças cardiovasculares (Pinheiro *et al.*, 2003). Em Portugal, o cancro da mama é a doença neoplásica com maior incidência e mortalidade na mulher (Boyle e Ferlay, 2004).

O processo neoplásico inicia-se quando uma célula normal adquire a capacidade de se multiplicar de forma indiferenciada e de invadir os tecidos adjacentes. Deste modo, aumenta o número de células que apresentam alterações de forma, tamanho e função e que podem possuir capacidade invasiva. Para que o cancro se desenvolva é necessário que, de uma forma cumulativa e continuada, se produzam alterações celulares durante um longo período de tempo (Ruddon, 1995).

A expressão alterada de alguns genes no processo de instalação do cancro tem sido um alvo de estudo por inúmeros autores. Em muitos casos a existência de cancro é acompanhada por mutações somáticas no gene p53, um supressor tumoral com funções na regulação do ciclo celular, reparação de lesões do ADN e na apoptose. As estimativas indicam que em cerca de 40% de todos os cancros da mama esporádicos ocorrem mutações neste gene. Além do gene p53, podem também ocorrer mutações noutros genes supressores tumorais, como é o caso do pRB, bem como nalguns inibidores de ciclinas dependentes de kinases e proteínas de reparação de lesões do ADN (DeBruin e Josephy, 2002; Antoniou e Easton, 2003).

Os trabalhos de investigação desenvolvidos nos últimos anos têm sido fundamentais no sentido de identificar factores de risco para o cancro, bem como factores que permitem estabelecer o prognóstico de doença e melhorar a eficácia terapêutica.

1.1 Factores de risco para o cancro da mama

O cancro da mama é uma doença complexa e multifactorial onde se verifica uma forte relação entre factores genéticos e ambientais (Martin e Weber, 2000). Pode ser hormono

dependente quando o seu crescimento está associado às hormonas, e não hormono dependente, quando o seu crescimento não é influenciado por hormonas.

Uma história familiar de cancro da mama pode indicar por si só uma possibilidade acrescida da existência de factor de risco genético. Os factores de risco descritos que contribuem para a etiologia do cancro da mama podem ser factores genéticos associados ou não ao metabolismo hormonal, bem como factores ambientais (DeBruin e Josephy, 2002).

1.1.1 Factores de risco associados ao metabolismo hormonal

O cancro da mama hormono-dependente tem sido relacionado com a exposição aos estrogénios. Um aumento no tempo de exposição aos estrogénios está associado com o aumento do risco, enquanto que, uma exposição reduzida parece ter um papel protector. Factores como uma menarca precoce, nuliparidade ou uma menopausa tardia, podem levar ao aumento do número de ciclos menstruais e estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento de cancro da mama. Pelo contrário, a diminuição do número de ciclos ovulatórios, que pode ser alcançada com um período de lactação mais longo, parece ter um papel protector (Martin e Weber, 2000; Mitrunen e Hirnoven, 2003).

Nos últimos anos surgiram inúmeros estudos sobre a terapia hormonal de substituição (THS). Os resultados apresentados contradizem-se e apesar da controvérsia à volta do tema continuar a recomendação para a THS mantém-se com algumas divergências entre o tempo da duração da terapêutica e/ou doses administradas (Marsden, 2003).

1.1.2 Factores de risco não associados ao metabolismo hormonal

Os estudos efectuados em populações migrantes e as variações geográficas da taxa de incidência de cancro da mama, sugerem que aspectos como a nutrição e estilo de vida podem influenciar o desenvolvimento da doença. A taxa de incidência de cancro da mama nos países Asiáticos e Mediterrâneos é significativamente mais baixa que nos países Norte-Americanos, contudo, após várias gerações, a taxa de incidência de cancro da mama na descendência das emigrantes asiáticas do norte da América aproxima-se da

taxa de incidência americana. Estes factos sugerem que para além dos factores genéticos, os factores ambientais associados a um estilo de vida diferente podem ter um papel na etiologia da doença (DeBruin e Josephy, 2002).

Actualmente a obesidade tornou-se um problema com repercussões mundiais. O excesso de massa corporal tem sido associado a 5% de todos os cancros na Comunidade Europeia. Alguns autores sugerem que a obesidade nas mulheres pode aumentar o risco para desenvolver cancro da mama, contudo, este conceito não se aplica da mesma forma às fases da adolescência, pré-menopausa e pós-menopausa. O aumento do tecido adiposo leva a que haja uma maior síntese de factores de crescimento provocando um aumento prematuro dos níveis de estrogénios. Estes factores de crescimento nas adolescentes estimulam o epitélio mamário mais cedo. O mesmo não acontece nas mulheres pré-menopáusicas, uma vez que as concentrações serológicas de estradiol não são muito afectadas pela obesidade. Neste caso a obesidade induz uma alteração muito pequena no risco de desenvolvimento de cancro da mama. Nas mulheres pós-menopáusicas a obesidade aumenta os níveis de estradiol e portanto verifica-se um aumento do risco (Gerber et al., 2003; Mitrunen e Hirnoven, 2003).

Os fitoestrogénios (FE) são moléculas difenólicas não esteróides de origem vegetal caracterizadas pela sua acção anti-estrogénica. Demonstrou-se em células cancerígenas *in vitro*, que os fitoestrogénios e os seus metabolitos tinham efeitos múltiplos desejáveis. Estes dados verificaram-se sobretudo nas populações orientais em que a dieta rica em soja e algas parece explicar a diminuição epidemiológica de muitas doenças hormono-dependentes. Hoje em dia, é do conhecimento geral que as plantas que contêm FE do tipo dos linhanos e das isoflavonas apresentam interesse na nutrição humana. Estes compostos bioactivos encontram-se principalmente nas sementes de soja, apesar de estarem presentes noutros vegetais, se bem que em menor concentração. Os mecanismos de acção das isoflavonas podem ser dependentes ou independentes dos receptores de estrogénios. Quando o mecanismo é dependente, exerce um efeito antagonista/agonista estrogénico parcial sobre os receptores de estrogénios, quando o mecanismo é independente, tem o efeito inibitório de enzimas que metabolizam os esteróides através da capacidade antioxidante dos FE. De certa forma, o seu efeito inibidor de enzimas chave, entre as quais se destaca a tirosina-quinase, é responsável por uma cascata de efeitos inibitórios a nível do desenvolvimento de neoplasias, como o

bloqueio da acção de vários factores de crescimento, por diminuição da síntese de receptores destes, tais como o factor de crescimento epidérmico (EGF), o factor de crescimento semelhante à insulina (ILGF) e o factor de crescimento tumoral (TGF). Como consequência destes fenómenos surge também a inibição da expressão dos proto-oncogenes e a estimulação da apoptose (Pires de Matos *et al.*, 2005).

O consumo de álcool tem sido também apontado como um factor de risco para o cancro da mama, embora, o álcool, por si só, não seja um agente carcinogénico, é metabolizado em potenciais compostos carcinogénicos, como por exemplo, o acetaldeído. No fígado, o álcool induz stress oxidativo para que outras substâncias carcinogénicas possam ser sintetizadas através de indução enzimática. Além disto, o álcool também aumenta a permeabilidade da membrana celular, facilitando assim o tráfego de substâncias carcinogénicas para dentro das células. No caso do tabaco, o efeito carcinogénico é explicado pela presença de hidrocarbonetos aromáticos. Estas substâncias aromáticas são capazes de se ligar ao ADN formando adutos de ADN, como estes não são reconhecidos durante o processo de replicação do ADN, provocam o aparecimento de erros, sendo estes os responsáveis pelo surgimento de células cancerígenas (Gerber *et al.*, 2003)

Um outro factor exógeno que se demonstrou ser um agente etiológico do cancro da mama é a radiação ionizante, e esta consegue explicar o risco aumentado para a doença em mulheres jovens que foram submetidas a tratamentos de radioterapia ou estiveram expostas a radiações por fugas nucleares (Martin e Weber, 2000).

1.1.3 Factores genéticos

Os factores anteriormente descritos nos pontos 1.1.1 e 1.1.2 podem também estar associados a factores genéticos. Em geral, o cancro da mama, tem origem num conjunto de alterações genéticas que são acumuladas, resultando na activação de proto-oncogenes e inactivação de genes supressores tumorais, que podem permitir às células adquirir resistência aos mecanismos de morte celular programada e conseguir assim, proliferar ou mesmo migrar até outros tecidos do organismo, escapando assim aos controlos habituais (Antoniou e Easton, 2003).

Apenas 5% a 10% de todos os casos de cancro da mama são de origem hereditária, isto é, identifica-se nestes uma mutação no ADN germinal que, ao ser transmitida à descendência, lhe confere um risco muito aumentado de desenvolver cancro da mama que, nalguns casos, pode chegar aos 80%. Este risco advém da elevada penetrância destas mutações (DeBruin e Josephy, 2002). Genes de elevada penetrância, como o BRCA1, o BRCA2 e o p53 apresentam variantes alélicas que predisõem os indivíduos portadores dessas variantes para o cancro hereditário.

Alterações genéticas de baixa penetrância em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de carcinogénios, nas vias de biossíntese e de metabolismo das hormonas esteróides têm sido observadas em cancros da mama esporádicos. Foi também observado que as alterações genéticas, nestes genes, tinham grande variabilidade inter-individual e eram atribuídas a polimorfismos genéticos (Mitrunen e Hirnoven, 2003). São exemplos, os genes da família da Glutatião-S-Transferase, que codifica enzimas que catalizam a conjugação de intermediários químicos reactivos com a glutatona para formar conjugados solúveis ou o gene da N-acetiltransferase 2 (NAT2), que é um componente importante do metabolismo dos carcinogénios.

Os polimorfismos compreendem as variações na sequência de ADN que existem em indivíduos normais de uma população, em que a variante menos frequente está presente em pelo menos 1% dessa população (Brookes, 1999). No genoma humano, as variações genéticas mais comuns são do tipo *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), ou seja, são variações que ocorrem apenas num único nucleótido (Misra e Kim, 2007). Assim, os polimorfismos nos genes de baixa penetrância podem determinar sub-populações de mulheres com maior tempo de vida de exposição a estes carcinogénios e aos produtos de reacção resultantes do metabolismo hormonal esteróide.

2 Os estrogénios e o cancro da mama

Os estrogénios ou hormonas estrogénicas são moléculas que estão directamente relacionadas com o crescimento, desenvolvimento, comportamento bem como pela regulação do ciclo reprodutivo (menstruação e gravidez), afectando muitas outras partes do corpo humano, tais como, os ossos, a pele e o cérebro. De todas as hormonas estrogénicas, o estradiol é a molécula mais abundante. Os estrogénios estimulam a proliferação celular porque promovem a síntese de ADN e a divisão celular nos órgãos sexuais femininos (útero e mama), sendo também um iniciador da síntese de proteínas específicas, resultando muitos destes efeitos de uma interacção directa dos estrogénios com um receptor intracelular. Estudos efectuados em modelos animais demonstraram que os estrogénios induzem a formação de tumores e estão associados com o cancro da mama. Muitos autores sugerem que o papel dos estrogénios no cancro da mama se relaciona com o facto de haver formação de adutos de ADN pelos metabolitos estrogénicos electrófilos reactivos e formação de espécies reactivas de oxigénio, o que leva a alterações do ADN por acção desses agentes oxidantes (Yue *et al.*, 2003).

A estimulação e proliferação das células mamárias pelos estrogénios, aumenta as possibilidades de uma célula adquirir uma mutação durante a síntese de ADN que pode levar à iniciação de uma neoplasia. Pensava-se que a alteração genética inicial aparecia apenas devido a mutações espontâneas ou através de alterações nos genes levadas a cabo por uma exposição à radiação ionizante ou ao fumo dos cigarros, por exemplo. No entanto, hoje em dia, os estudos científicos sugerem também um papel activo dos produtos resultantes do metabolismo dos estrogénios, pois estes produtos metabólicos podem também actuar como iniciadores das alterações celulares (Mitrunen e Hirvonen, 2003).

Tem sido descrita variabilidade inter-individual no metabolismo de carcinogénios, bem como nas vias de biossíntese e metabolismo das hormonas esteróides. Esta variabilidade tem sido atribuída a polimorfismos genéticos em genes que codificam enzimas que intervêm no metabolismo das substâncias carcinogénicas e no metabolismo dos estrogénios, como alguns membros da família do citocromo P450. Os polimorfismos verificados nestas enzimas podem determinar sub-populações de mulheres, que ao

longo da sua vida, terão uma maior exposição aos estrogénios, aos seus metabolitos e a outros carcinogénios (Mitrunen e Hirvonen, 2003).

Os dados epidemiológicos indicam que, entre outras causas, existe um envolvimento hormonal muito importante, nomeadamente de estrogénios, no aparecimento do cancro da mama. Uma vez que se verifica uma associação entre o risco de desenvolver cancro da mama e a exposição prolongada aos estrogénios é importante analisar alguns parâmetros relacionados com a homeostase dos estrogénios, como a sua síntese e catabolismo (Clemons e Goss, 2001).

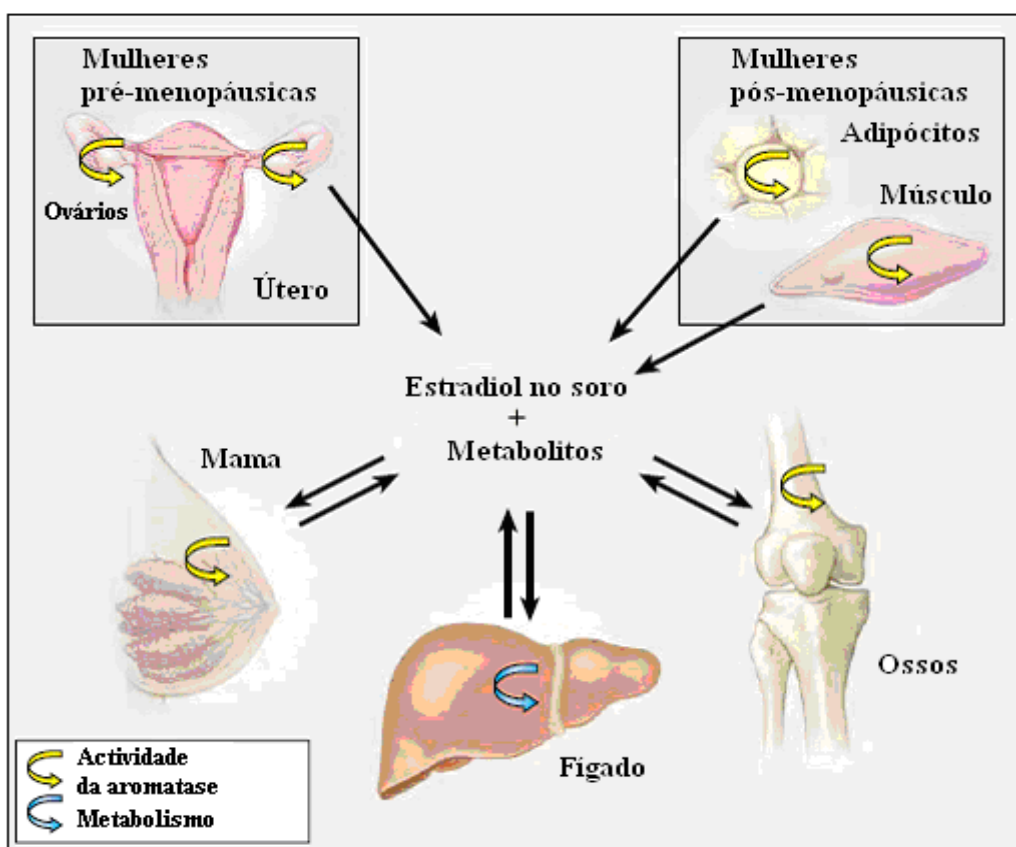


Figura nº1: Locais de síntese e de acção dos estrogénios nas mulheres pré e pós-menopáusicas, adaptado de Clemons e Goss, 2001.

Nas mulheres em pré-menopausa, os ovários são os principais responsáveis pela síntese de estrogénios, e apenas uma pequena quantidade provém de órgãos periféricos. Pelo contrário, em mulheres pós-menopausa, os estrogénios vêm predominantemente das reacções da aromatase sobre os androgénios das glândulas adrenais e dos ovários nos tecidos não gonadais: fígado, músculo e tecidos gordos, figura nº1.

A aromatase é a enzima responsável pela última fase de síntese dos estrogénios (estrone e estradiol), a partir dos substratos androgénicos, androstenediona e testosterona. Esta enzima pertence à superfamília do citocromo P450 e é codificada pelo gene CYP19. Existe em grande concentração na placenta e nos folículos dos ovários e em mais baixas concentrações no tecido adiposo subcutâneo, no fígado, músculos, cérebro e mama normal. A síntese de estrogénios através da acção da aromatase sobre os tecidos gordos é um processo contínuo e não cíclico como acontece com a síntese de estrogénios pelos ovários. Apesar de ainda não ser totalmente conhecido qual o papel fisiológico da síntese de estrogénios pela via da aromatase, vários cientistas têm discutido uma possível relação entre a biossíntese de estrogénios no tecido adiposo e a condição de algumas doenças, como o cancro da mama e do endométrio (Zhu e Conney, 1998). Estudos de imunohistoquímica em células de tumor da mama humanas revelaram que a actividade da aromatase é mais elevada nas células dos adipócitos do estroma que rodeia as células do carcinoma mamário do que nas células do estroma que distam do tumor, o que sugere que a aromatização enzimática é uma fonte importante de estrogénios para os tumores mamários.

Os estrogénios atravessam a membrana celular e nuclear por difusão passiva e algumas células e tecidos específicos têm receptores de estrogénio, onde os estrogénios se ligam formando um complexo ligando-receptor. Os níveis de receptores de estrogénios são baixos no tecido mamário normal, contudo, de mulher para mulher, os seus níveis variam, sendo que os níveis mais altos se correlacionam com o aumento do risco para o cancro da mama. Existem dois tipos de receptores, o α e o β . O receptor α apresenta maior afinidade para os estrogénios que o receptor β . *In vitro*, os receptores α e β formam heterodímeros entre eles, em que o receptor β diminui a afinidade do receptor α para os estrogénios, actuando como um regulador fisiológico dos efeitos na proliferação potenciados pelo receptor α . O grau de variabilidade na expressão dos receptores α e β no tecido mamário normal é desconhecido, mas a expressão relativa do receptor α em relação ao receptor β é mais alta no tecido mamário tumoral do que no tecido normal, o que sugere que o balanço entre a expressão dos dois receptores é importante para determinar a sensibilidade do tecido aos estrogénios e assim o risco relativo de carcinogénese (Clemons e Goss, 2001). Além da acção genómica, os receptores de estrogénios podem também ter uma acção não genómica, dado que estes existem na

membrana plasmática. Através deste processo os estrogénios podem activar várias proteínas kinases e aumentar os níveis de segundos mensageiros, como o AMPc, em poucos minutos.

Os estudos efectuados em ratos têm demonstrado que os estrogénios ou os seus metabolitos têm uma acção carcinogénica nalguns tecidos, como os rins, o útero e as glândulas mamárias. Na figura nº2, pode ver-se a via de metabolismo e o mecanismo de acção dos estrogénios que pode contribuir para a acção carcinogénica destes (Yager e Davidson, 2006). Para que as hormonas estrogénicas sejam eliminadas do organismo têm que se tornar solúveis em água, de modo a que sejam excretadas na urina e/ou fezes e, mesmo após a sua metabolização nesse sentido, os produtos obtidos podem manter actividade hormonal.

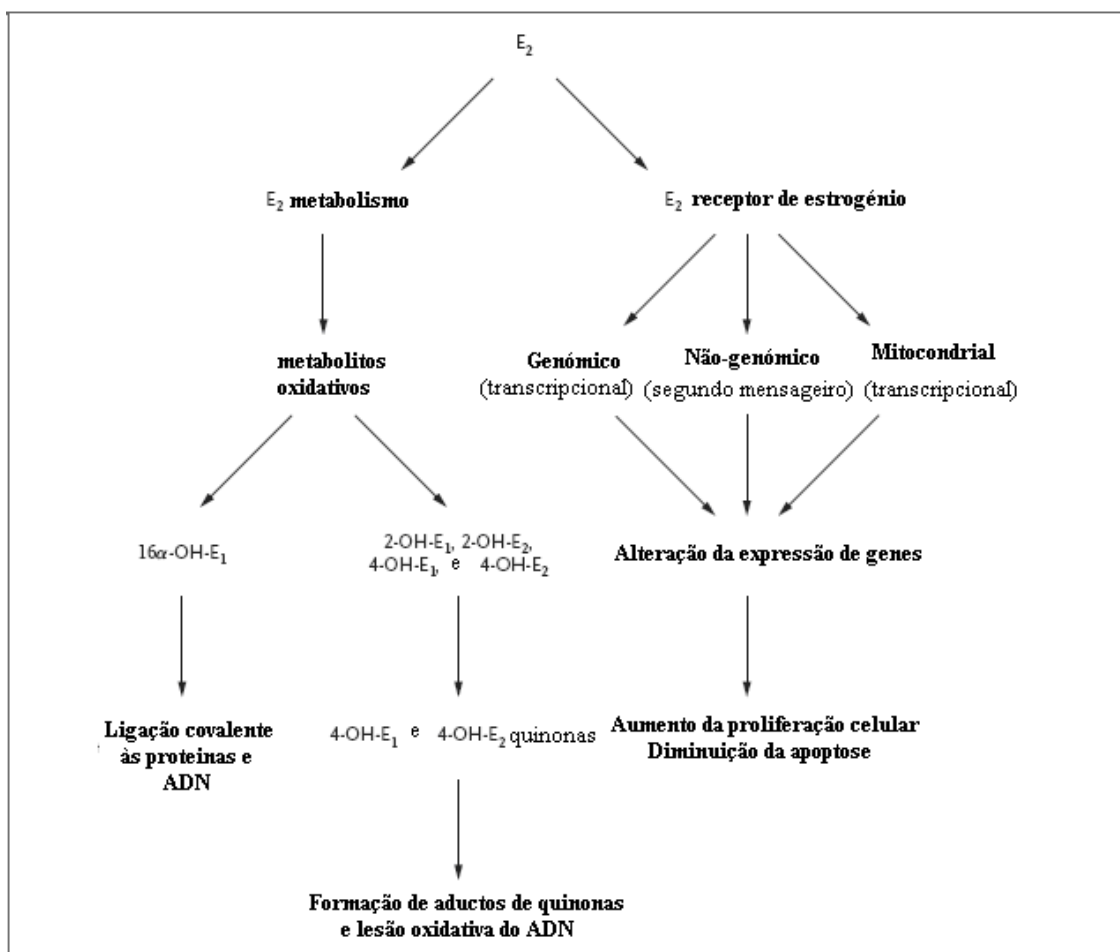


Figura nº2: Via de metabolismo e mecanismo de acção dos estrogénios, adaptado de Yager e Davidson, 2006.

Nos seres humanos, as reacções de metabolismo de fase I envolvem diversas enzimas do citocromo P450, que são responsáveis pelas reacções de catálise do metabolismo oxidativo da estrona em estradiol. Os principais produtos destas reacções de catálise são o 2-hidroxicatecol estrogénio em que intervém as enzimas do citocromo P450 1A1, 1A2 e 3A, enquanto que na formação do 4-hidroxicatecol estrogénio intervém a enzima do citocromo P450 1B1 (Clemons e Goss, 2001). Estas reacções podem ocorrer por hidroxilação no anel A ou no anel D e a geração de grupos hidroxilo em diferentes locais da molécula de estrogénio afecta as propriedades biológicas dos respectivos metabolitos, tornando-os estrogénicos, não estrogénicos ou mesmo carcinogénicos. Foi demonstrado que a razão da concentração de 4-hidroxiestradiol para 2-hidroxiestradiol é de 4:1 num extracto humano de cancro da mama. Assim tem sido sugerido um papel na carcinogénese mamária do 4-hidroxiestradiol, pois este revelou ser carcinogénico no rim no hamster Golden Syrian, enquanto o 2-hidroxiestradiol não tinha este efeito (Yager e Davidson, 2006). O 4-hidroxiestradiol é semelhante ao estradiol na sua habilidade para se ligar ao receptor de estrogénio, activando-o. Uma vez que é um produto hormonal activo pode estimular a proliferação e o crescimento celular como a hormona parental, o estradiol, tal como também pode originar radicais livres através do ciclo redox que induzem lesões no ADN (Zhu e Conney, 1998).

O metabolismo adicional do catecol estrogénio leva à formação de semiquinonas e quinonas. A 2,3-quinona liga-se ao ADN de forma estável, enquanto a 3,4-quinona consegue formar aductos instáveis com a adenina e a guanina do ADN, que leva à depurinação e à ocorrência de mutações, tanto *in vivo* como *in vitro*. Para além destas reacções, ocorre ainda no ciclo redox a redução das quinonas em hidroquinonas e catecóis, o que permite formar espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente o ião superóxido, causando o stress oxidativo dos lípidos e do ADN (Cavalieri *et al.*, 2000).

As reacções do metabolismo de fase II, que incluem, entre outras, reacções de sulfonação, metilação e reacções de conjugação com a glutathiona, encontram-se também activas no tecido mamário e podem proteger contra as lesões causadas pelos metabolitos reactivos dos químicos endógenos e exógenos (Yager e Davidson, 2006). O 2-hidroxiestradiol e o 4-hidroxiestradiol são inactivados pela enzima COMT (Catecol-O-metiltransferase), as quinonas podem ser conjugadas com a glutathiona, e os radicais

superóxidos são reduzidos a peróxido de hidrogénio espontaneamente ou por acção das superóxido dismutases (Mitrinen e Hirvonen, 2003).

3 Polimorfismos em genes associados ao risco de desenvolver cancro da mama

As variações genéticas do genoma humano são hoje em dia uma fonte de estudo para identificar os factores de risco ao aparecimento de cancro. O número de variações que ocorre na sequência genética em cada indivíduo é muito elevado e representa uma oportunidade de investigação da etiologia da doença e das diferenças inter-individuais que se verificam na resposta à terapêutica em geral e à terapêutica associada ao cancro da mama. O estudo destas variações genéticas pode permitir estabelecer critérios para a prevenção e para melhorar a eficácia terapêutica (Erichsen e Chanok, 2004)

Os principais genes até agora descritos na susceptibilidade ao cancro da mama são o BRCA1 e o BRCA2. Contudo as mutações encontradas nestes dois genes apenas conseguem explicar uma pequena percentagem de todos os cancros da mama. Assim, nos últimos anos, tem-se estudado os polimorfismos funcionais existentes em genes das vias de metabolismo do estradiol/estrone, como o CYP1A1, CYP1B1 e COMT, entre outros (Marchand *et al.*, 2005).

3.1 Gene da CYP1B1

O gene da CYP1B1 está localizado no cromossoma 2, sendo constituído por 3 exões e 2 intrões que cobrem uma sequência de 8,5 kilobases de ADN genómico. Este gene codifica uma proteína de 543 aminoácidos, que se encontra normalmente expressa no núcleo da maioria dos tipos celulares. A enzima CYP1B1 é expressa em vários tecidos do organismo, no entanto, nas células tumorais verifica-se que a sua expressão apresenta níveis mais elevados do que nas células normais dos tecidos adjacentes. Apesar da expressão da CYP1B1 ter sido observada em vários cancros analisados até à data (colón, pulmão, rins, bexiga e glaucoma), a sua expressão é particularmente elevada em muitos cancros hormono dependentes, como o cancro da mama, ovário e próstata, o que está de acordo com os trabalhos publicados por McFadyen *et al.*, 1997 e Sutter *et al.*, 1996. Uma vez que apresenta uma expressão diferencial nos tecidos tumorais, pode ser

considerada um alvo terapêutico para o tratamento de vários tipos de cancro (Sissung *et al.*, 2006).

Para o gene CYP1B1 estão descritos vários polimorfismos e mutações. Pelo menos seis polimorfismos neste gene foram identificados na população Anglo-americana, quatro dos quais resultam numa substituição de aminoácidos (Hanna *et al.*, 2000). Foi descrita uma mutação por transversão de um G por C no exão 3 do gene da CYP1B1 que resulta na substituição de uma valina (GTG) por uma leucina (CTG) no codão 432 (Zheng *et al.*, 2000). Este polimorfismo parece conferir um maior risco no desenvolvimento de cancro da mama, contudo, nem todos os estudos demonstram esta associação (Wen *et al.*, 2005).

Algumas variantes polimórficas deste gene apresentam uma actividade catalítica 2,4 a 3,4 vezes maior, pelo que alguns polimorfismos dentro deste gene têm sido implicados no risco diferencial de desenvolvimento de cancro da mama (Sissung *et al.*, 2006, Wen *et al.*, 2005). A variante da enzima considerada *wild-type* depende da população estudada, segundo Sissung *et al.* e Taioli *et al.* a variante *wild-type* é o genótipo Leu-Leu, segundo Zheng *et al.* a variante *wild-type* é o genótipo Val-Val. Contudo todos os autores concordam que o genótipo Val-Val é aquele que expressa uma enzima com actividade catalítica aumentada.

Assim, torna-se importante determinar qual o genótipo da enzima CYP1B1, pois ela intervém no metabolismo dos estrogénios, sendo responsável pela formação do 4-hidroxiestradiol, um catecol estrogénio que retém uma significativa actividade estrogénica. O aumento de síntese de 4-hidroxiestradiol induzido pelo genótipo Val-Val pode ser um factor de risco para o cancro da mama, pois este metabolito pode entrar no ciclo redox e originar radicais livres que induzem lesões no ADN assim como pode aumentar os efeitos tóxicos do estradiol (Modugno *et al.*, 2005). A CYP1B1 é também responsável pela activação de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

3.2 Gene da MTHFR

Durante a última década, os polimorfismos genéticos no gene que codifica a enzima methilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), têm sido associados com o risco de desenvolver cancro (Reljic *et al.*, 2007).

Foi descrito um polimorfismo comum para este gene, o polimorfismo Ala²²⁵Val que consiste na substituição de uma alanina por uma valina no codão 225, no domínio N-catalítico. Esta variante alélica origina uma enzima mais termolábil e com menor actividade catalítica específica. Foi demonstrado que para os indivíduos homozigóticos, a enzima apresenta aproximadamente 30% de actividade catalítica, enquanto que para os indivíduos heterozigóticos a actividade catalítica da enzima é aproximadamente 65 % (Shrubsole *et al.*, 2004).

A methilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima polimórfica que está envolvida no metabolismo do folato e tem também um papel associado à metilação e reparação do ADN nas células que se encontram em divisão (Semenza *et al.*, 2003). A MTHFR é responsável pela conversão do 5,10-metilenotetrahidrofolato, a principal forma de folato intracelular, em 5-metiltetrahidrofolato, a principal forma de folato em circulação (Rock, Lampe e Patterson, 2000).

O polimorfismo Ala²²⁵Val tem sido associado a diversos cancros. Na maioria dos estudos efectuados em cancro do cólon e do recto, o genótipo Val/Val (CC) da MTHFR tem sido associado, no geral, a uma redução do risco entre os indivíduos que têm um elevado consumo de folato, no entanto, naqueles em que o consumo de folato é mais baixo há um aumento do risco (Langsenlehner *et al.*, 2003).

A actividade catalítica reduzida da enzima MTHFR resulta numa diminuição do produto 5-metiltetrahidrofolato disponível para a conversão da homocisteína em metionina pela enzima metionina sintetase. A metionina é depois convertida em S-adenosilmetionina, um importante dador de grupos metilo para a metilação do ADN e para as reacções catalisadas pela COMT (Marchand *et al.*, 2004). Fenómenos epigenéticos, como a activação de protooncogenes por hipometilação das suas regiões promotoras, a inactivação de genes supressores tumorais por hipermetilação ou a alteração dos

padrões de metilação do gene do receptor de estrogénio podem estar associados com a carcinogénese das células mamárias. Na ausência destes eventos, pode ocorrer instabilidade genómica, que pode ser crítica para a transformação oncogénica das células humanas. Como o folato é importante para a manutenção da síntese e metilação do ADN, pode haver uma ligação entre a enzima MTHFR e a carcinogénese (Campbell *et al.*, 2002).

Não está ainda esclarecido o papel que desempenham os polimorfismos do gene MTHFR com o risco de cancro da mama, e os estudos já publicados apresentam algumas divergências (Jakubowska *et al.*, 2007).

3.3 Gene da COMT

A existência de um polimorfismo do tipo SNP na região codificante do gene da COMT humana tem como resultado a substituição de uma metionina por uma valina na posição 158 da COMT ligada à membrana e na posição 108 da COMT solúvel. Este polimorfismo codifica uma variante da enzima catecol-*O*-metiltransferase (COMT) termolábil, que no caso dos homozigóticos LL (COMT-LL) confere um decréscimo da actividade enzimática específica. Os indivíduos heterozigóticos (COMT-HL) apresentam uma actividade enzimática intermédia e os indivíduos homozigóticos *wild-type* HH (COMT-HH) têm uma actividade enzimática alta (Modugno *et al.*, 2004).

A COMT pode ser encontrada tanto na forma de uma proteína solúvel, como na forma de uma proteína ligada à membrana. Ambas as proteínas são codificadas por um único gene no cromossoma 22q11.2, mas para que a sua expressão se inicie são precisos diferentes promotores (Sazci *et al.*, 2004). Esta enzima encontra-se distribuída por vários tecidos do organismo, principalmente no cérebro, fígado, rins, endométrio e na mama. No sangue é encontrada principalmente nos eritrócitos. Os seus substratos fisiológicos incluem uma grande variedade de compostos químicos, tais como, neurotransmissores catecolamínicos e catecóis estrogénios endógenos e exógenos (Thompson *et al.*, 1998).

A COMT é a principal responsável pela inactivação dos catecóis estrogénios, ou seja, o 2-hidroxiestradiol e o 4-hidroxiestradiol. Estes dois produtos são produzidos pelas reacções inerentes ao metabolismo dos estrogénios, têm actividade hormonal e produzem stress oxidativo, o qual é responsável por alterações na sequência de ADN, figura nº3 (Matsui *et al.*, 2000).

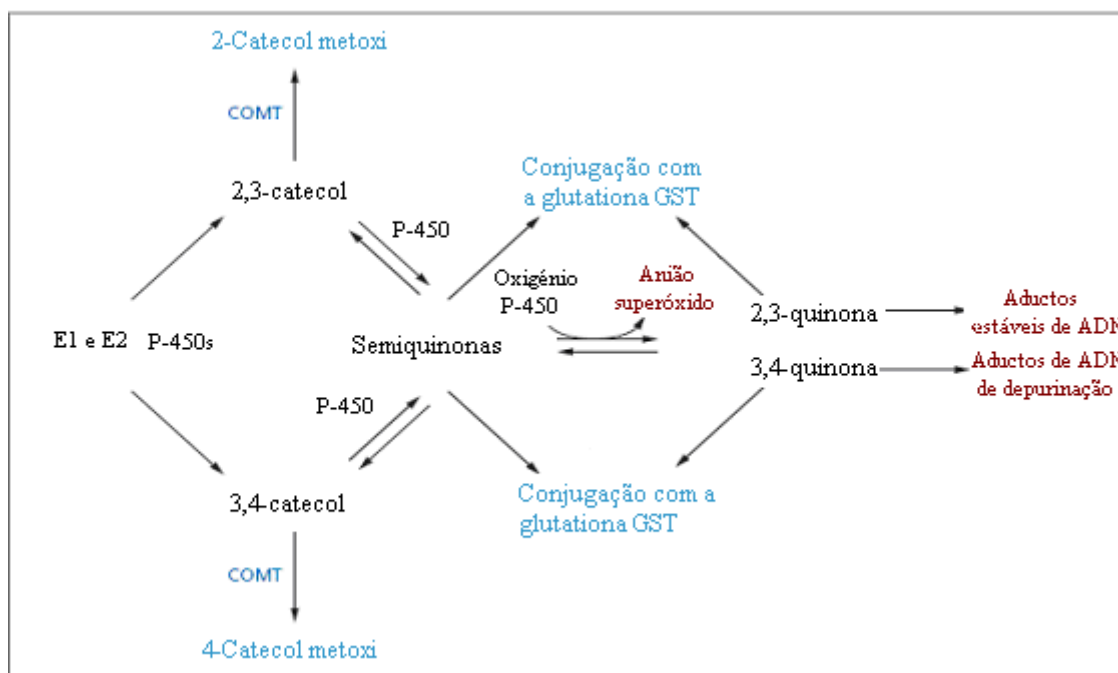


Figura nº3: Produtos resultantes da oxidação dos estrogénios, adaptado de Cavaliere *et al.*, 2000.

Estudos prévios sobre a reactividade química e a potencial genotoxicidade dos catecóis estrogénios sugeriam que a *O*-metilação enzimática era uma via de destoxificação para estes metabolitos dos estrogénios. Contudo, existem hoje em dia vários estudos que indicam que os efeitos biológicos do 2-metoxiestradiol não estão associados com o estradiol ou com outros produtos metoxi derivados do estrogénio. Sendo uma das principais funções da COMT a inactivação de catecóis tóxicos endógenos e/ou exógenos com actividade biológica, tem-se associado esta enzima com o risco de cancro da mama (Zhu e Conney, 1998). Tendo em conta o papel funcional da COMT e da CYP1B1 nas vias do metabolismo dos estrogénios, torna-se também importante considerar qual é o seu efeito combinado (Ritchie *et al.*, 2001).

4 Os genes de susceptibilidade do cancro da mama BRCA1 e BRCA2

A análise genética de várias famílias com agregação de múltiplos casos de cancro da mama e dos ovários permitiu a localização do primeiro gene de susceptibilidade do cancro da mama no braço curto do cromossoma 17 na posição 21.3 (King *et al.* 1990). O gene BRCA1 foi identificado através de clonagem posicional em 1994. Este gene cobre aproximadamente 100 kilobases de sequência genómica, distribuída em 24 exões e codifica uma proteína de 1863 aminoácidos. O gene BRCA1 tem homologia com o domínio “RING” finger na extremidade amino-terminal, com uma sequência de localização nuclear (NLS) no exão 11 e com uma região C-terminal conservada, a BRCT. Análises posteriores efectuadas em famílias com história de cancro da mama não ligado ao BRCA1 levaram à descoberta de outro gene de susceptibilidade do cancro da mama, o BRCA2. O BRCA2 está localizado no cromossoma 13 na posição q12, cobre 70 kilobases de sequência genómica, distribuída por 27 exões e codifica uma proteína de 3418 aminoácidos, como se pode ver na figura nº5, (Easton e Thompson, 2004).

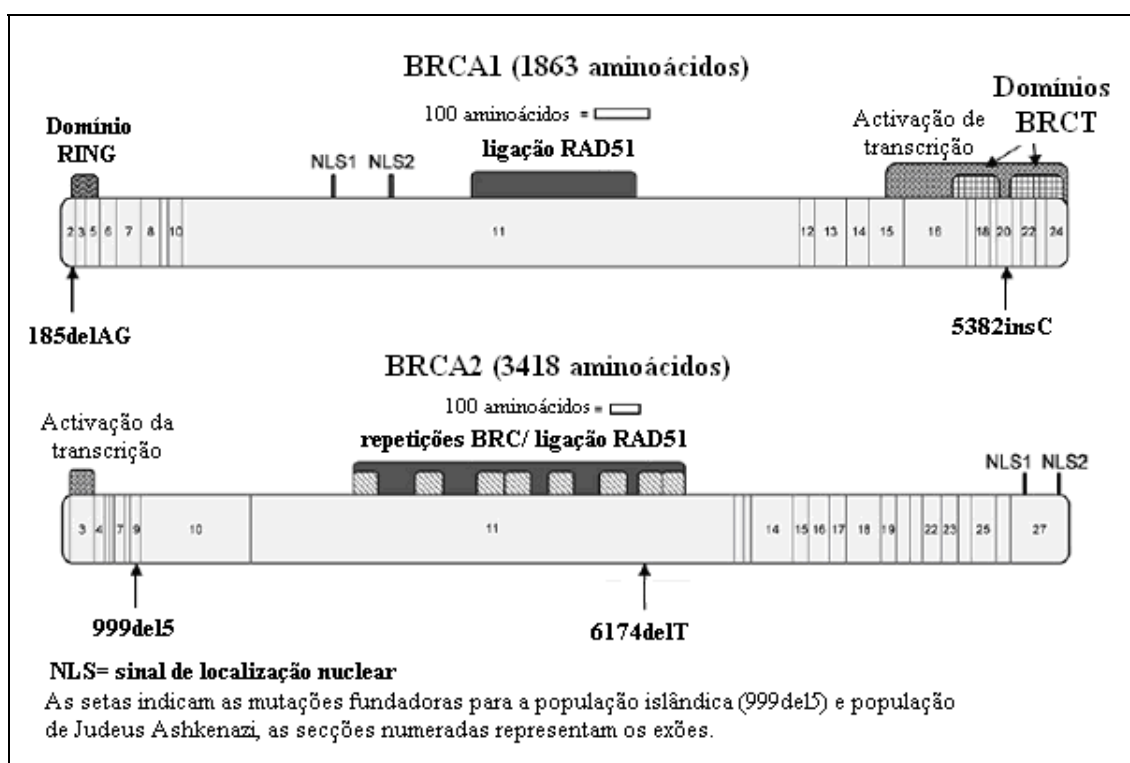


Figura nº4: Domínios funcionais e mutações fundadoras dos genes BRCA1 e BRCA2, adaptado de Thompson e Easton, 2004.

No BRCA1 o exão 11 compreende 60 % de todo o gene, o que faz com que seja um dos maiores alvos para a ocorrência e detecção de mutações (Dufloth *et al.*, 2005).

Mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 representam um factor de predisposição genética e dependendo da população em estudo, explicam 15% a 45% do cancro da mama hereditário e pelo menos 80% dos casos familiares de cancro da mama e ovário. Mulheres com mutações no gene BRCA1 têm, ao longo da vida, um risco de cancro da mama que atinge os 60% a 80% e um risco de cancro do ovário de 20% a 40%. No caso de mulheres portadoras de mutações no gene BRCA2, o risco de cancro da mama é de 60% a 85% e o risco de cancro do ovário é de 10% a 20% (Antoniou *et al.*, 2003).

Seguindo o conceito do modelo de “two-hit” proposto por Knudson (1971) para a inactivação de um gene supressor tumoral, tanto o BRCA1 como o BRCA2 são considerados genes supressores tumorais clássicos por duas razões. Primeiro, as mutações germinativas do BRCA1 e/ou BRCA2 (“first hit”) estão associadas com o desenvolvimento de tumores, e levam a uma predisposição para desenvolver cancro da mama nos seus portadores. Segundo, a perda de heterozigotia (perda do alelo wild-type), “second hit” é frequentemente observada em tumores da mama esporádicos e familiares. Estes dois eventos levam à inactivação da função de gene supressor tumoral e à perda do controlo do crescimento celular (Hofmann e Schlag, 2000).

O gene BRCA1, nos tecidos em rápida proliferação celular, pode ajudar a manter a integridade do material genético. Tanto o BRCA1 como o BRCA2 interagem com a proteína Rad51, uma proteína que está implicada na recombinação e reparação do ADN. O facto de se ter verificado que a proteína BRCA1 tinha interacção com o gene p53 reforça a teoria de que o gene BRCA1 está envolvido na reparação das lesões do ADN. Foi demonstrado que o BRCA1 actua como um co-activador transcricional e aumenta a transcrição dependente dos promotores P21 e BAX. Para além do p53, foram identificados outros genes que interagem com o BRCA1, como o caso do c-myc e do gene de susceptibilidade do retinoblastoma (RB1). O c-myc é um oncogene que está directamente ligado à carcinogénese mamária e é um dos genes de resposta rápida activados na fase G₁, o que resulta na activação de um número de outros genes com funções no ciclo celular. Assim, o papel primário do BRCA1 prende-se com a resposta

às lesões do ADN, pelo processamento de sinais que chegam após uma lesão (Clarke, 2000; Arai *et al.*, 2004). Alguns estudos demonstraram também um envolvimento do BRCA1 e do BRCA2 em complexos que se activam para reparar as falhas da cadeia dupla de ADN e iniciam a recombinação homóloga, ligando assim a manutenção da integridade do material genético à supressão tumoral (Yoshida e Miki, 2004). Para além destes factos, verificou-se que a expressão do BRCA1 é induzida durante a puberdade e gravidez, quando os níveis de estrogénios se encontram muito elevados, pelo que se julga que os estrogénios possam estimular a expressão deste gene (Duncan, Reeves e Cooke, 1998). Estudos *in vitro*, em células de cancro da mama humanas demonstraram que a proteína BRCA1 inibia as vias de transcrição mediadas pelo receptor de estrogénio α (RE- α) relacionadas com a proliferação celular. Assim, durante os períodos de rápida divisão e multiplicação celular, o BRCA1 pode também suprimir os sinais de iniciação induzidos pelos estrogénios por activação do RE- α (Clarke, 2000).

Até à data foram encontradas centenas de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. As mutações identificadas estão distribuídas por toda a região codificante destes genes. A maioria das mutações conhecidas é da linha germinativa e resultam na formação de proteínas truncadas, causadas por mutações do tipo “frameshift” ou “nonsense” ou por alterações nos locais de “splicing” (Hofmann e Schlag, 2000). Estão descritas mais de 600 mutações para o gene BRCA1 e 450 mutações para o gene BRCA2, de acordo com informações do Breast Cancer Information Core website (Dufloth *et al.*, 2005).

A maioria das mutações encontradas nestes dois genes tem uma origem geográfica distinta, no entanto, algumas são partilhadas por várias populações. Nestes genes, observa-se a existência de várias mutações fundadoras. O efeito fundador é a ocorrência com elevada frequência de uma ou mais mutações específicas numa população, devido à presença dessas mesmas mutações num ancestral. Nos judeus Ashkenazi, as mutações 185delAG e 5382insC no BRCA1 e 6174delT no BRCA2 compreendem quase a totalidade de todas as mutações encontradas nestes genes para esta população. Estas mutações também foram observadas em caucasianos não judeus mas com uma incidência muito menor. Existem também outras mutações fundadoras do BRCA1 e BRCA2 identificadas na Finlândia, Islândia, Rússia, Polónia e Noruega, entre outros (Thompson e Easton, 2004).

Historicamente, na região da Beira Interior existe uma das maiores comunidades de origem judaica do país. Na literatura dos últimos anos tem-se vindo a fazer referência ao facto de que na população judaica, as três mutações fundadoras nos genes BRCA1 e BRCA2 são responsáveis pela vasta maioria dos cancros familiares hereditários da mama e do ovário. Assim, com a realização deste trabalho, houve um interesse em verificar a existência destas mutações (185delAG, 5382insC e 6174delT) nas mulheres estudadas.

2 Objetivos

2 Objectivos

Este trabalho tem como objectivo estudar os polimorfismos CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met como factores de risco de cancro da mama em mulheres da Beira Interior.

Para alcançar estes objectivos:

- Determinou-se a distribuição por frequências dos polimorfismos CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met em mulheres com cancro da mama e em mulheres sem qualquer patologia;
- Analisou-se a relação entre a distribuição por frequências dos polimorfismos estudados e a susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro da mama;
- Analisou-se a prevalência de algumas mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 em mulheres com diagnóstico de cancro da mama da Beira Interior.

3 Materiais e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Amostra populacional

A amostra populacional é constituída por 62 mulheres da Beira Interior, das quais 32 têm cancro da mama e 30 são mulheres saudáveis. Todas as mulheres envolvidas neste estudo deram o seu consentimento prévio através de um protocolo de colaboração entre o Centro de Investigação das Ciências da Saúde (CICS) e o CHCB. O trabalho decorreu entre Março de 2007 e Outubro de 2007.

- Mulheres com cancro da mama

Analisaram-se amostras de sangue de 32 mulheres com cancro da mama com idades de diagnóstico compreendidas entre os 27 anos e os 79 anos (idade média de diagnóstico de 54,0 anos; desvio padrão (dp) de 21,2 e mediana de 54,0 anos). O diagnóstico foi efectuado com base nalgumas características clínico-patológicas como o exame mamário, determinações bioquímicas dos marcadores Ca15.3 e CEA e a avaliação do estadiamento do tumor de acordo com o sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástase). Em alguns casos não foi possível obter informações relativamente ao estadio do tumor.

- Mulheres saudáveis

Analisaram-se também amostras de sangue de 30 mulheres saudáveis com idades compreendidas entre os 21 anos e os 62 anos (idade média de 45,5 anos; dp de 10,7 e mediana de 47,0 anos)

3.1.2 Colheita das amostras de sangue

A colheita das amostras de sangue foi efectuada por punção venosa sob vácuo para tubos de colheita com EDTA. Foram colhidos cerca de 2 mL de sangue total.

3.1.3 Reagentes usados na elaboração do trabalho experimental

- Kit de extracção de ADN genómico, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison USA)
- Agarose (Seakem LE Agarose, BMA Rockland, ME USA)
- Tampão TAE 1× (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA)
- Enzimas de restrição: Eco57I, Hinf I, NlaIII, DdeI e *Bbr*PI (Fermentas, Life Sciences)
- dNTP's (Amersham Biosciences)
- Cloreto de magnésio, tampão de amplificação e Taq Polymerase (Promega, Corporation)
- Brometo de etídio (stock solution, Amresco)
- Tampão de aplicação (Loading Buffer, Takara Bio Inc.)
- Marcador de ADN (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas Life Sciences).

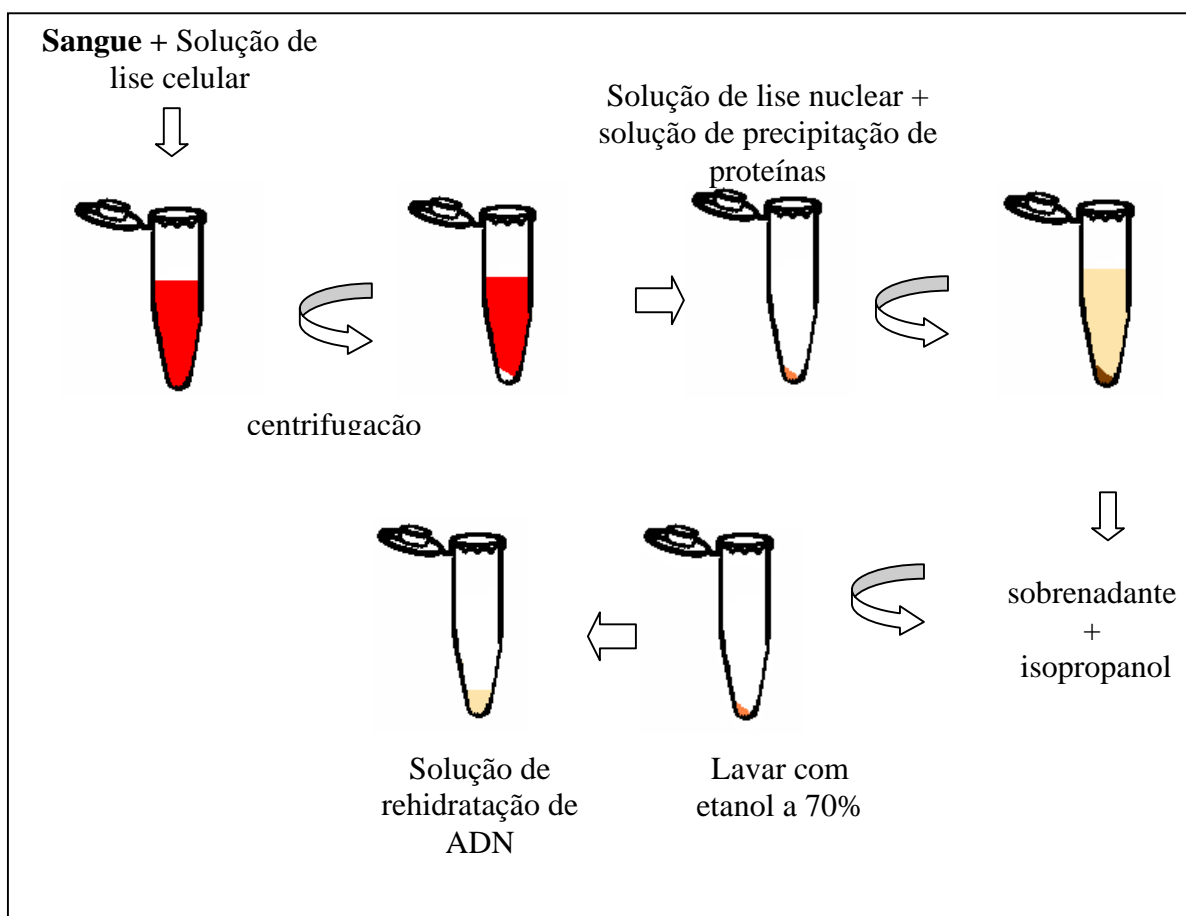
3.1.4 Aparelhos usados na elaboração do trabalho experimental

- Espectofotómetro Pharmacia Biotech (Ultraspect 3000, UV, Visível)
- Termociclador (Thermo Electron Corporation)
- Aparelho com lâmpada de luz ultra-violeta Vilber Lourmat

3.2 Métodos

3.2.1 Extracção de ADN das amostras de sangue total

Para se efectuar a extracção do ADN do sangue usou-se um Kit de extracção de ADN genómico, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison USA) de acordo com o seguinte procedimento:



Todos os reagentes e amostras foram usados nos volumes indicados no manual técnico que acompanha o Kit.

3.2.2 Determinação da pureza e concentração do ADN

A pureza do ADN foi obtida através da determinação da absorvência (Abs.) a 260 nm e 280 nm, num espectrofotómetro Pharmacia Biotech (Ultraspect 3000, UV, Visível). Considerou-se de elevada qualidade o ADN cuja a razão Abs_{260}/Abs_{280} se situou entre 1,8 e 2,0.

A concentração de cada amostra ADN foi determinada por espectrofotometria, segundo a equação:

$$[ADN]=D.O._{260} \times 50 \text{ ng/mL} \times fd$$

em que, $D.O._{260}$ é a densidade observada a 260 nm e fd , o factor de diluição. Para cada amostra utilizou-se 10 μL de ADN total, ajustando-se o volume para 500 μL com água MiliQ, obtendo-se então um factor de diluição de 50.

3.2.3 Determinação dos génotipos dos polimorfismos Val⁴³²Leu do gene da CYP1B1, Ala²²⁵Val do gene da MTHFR e Val¹⁵⁸Met do gene da COMT por PCR-RFLP

A determinação do génotipo dos polimorfismos Val⁴³²Leu do gene da CYP1B1, Ala²²⁵Val do gene da MTHFR e Val¹⁵⁸Met do gene da COMT foi efectuada por amplificação de ADN através de PCR (Polymerase Chain Reaction). A digestão dos fragmentos de ADN foi efectuada por enzimas de restrição e a análise desses fragmentos por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism).

3.2.3.1 Determinação do genótipo do polimorfismo Val⁴³²Leu do gene da CYP1B1

3.2.3.1.1 Amplificação de ADN por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para um volume total de 50 µL adicionou-se 200 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada primer (metabion), 10 mM de dNTP's, 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 1U de Taq Polymerase. Os primers usados para amplificação do fragmento de ADN pretendido estão descritos na tabela nº 1 (Zheng *et al.*; 2000).

Tabela nº1: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN do gene da CYP1B1.

Primer	Sequência
CYP 1	5'-TCA CTT GCT TTT CTC TCT CC-3'
CYP 2	5'-AAT TTC AGC TTG CCT CTT G-3'

A amplificação dos fragmentos do gene da CYP1B1 foi efectuada num termociclador, onde se incluiu sempre um controlo negativo (reação sem adição de amostra de ADN). As condições do programa estão referidas na tabela nº2.

Tabela nº2: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene da CYP1B1.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	1 min	×1
94	30 s	×35
60	30 s	
72	40 s	
72	7 min	×1

Estas condições permitem a amplificação de fragmentos de ADN com 650pb. A amplificação de cada fragmento de ADN foi confirmada através da análise de 10 µL de produtos de PCR por electroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os géis foram preparados com tampão TAE, sendo este também

usado como tampão de electroforese. As amostras foram aplicadas no gel após a mistura com 1 μ L de tampão de aplicação. Em todos os géis foi aplicado um marcador de ADN. Os géis foram visualizados com uma lâmpada de luz ultra-violeta, num aparelho Vilber Lourmat, figura nº6.

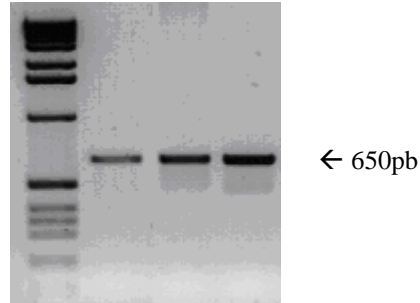


Figura nº5: Resultado da reacção de PCR do gene CYP1B1 em gel de agarose a 2%.

3.2.3.1.2 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*)

Para se determinar o genótipo de cada amostra de ADN efectuou-se uma digestão de 16 horas a 37 °C, usando como enzima de restrição a Eco57I. A composição de cada reacção está referida na tabela nº3.

Tabela nº3: Composição da reacção de digestão usando a enzima de restrição Eco57I, para determinação do genótipo do gene da CYP1B1.

Reagentes	Volume (μ L)
Produtos de PCR	25,0
H ₂ O estéril	18,8
Tampão G*	5,0
SAM*	1,0
Enzima (Eco57I)*	0,2

*Fermentas, Life Sciences

Após a digestão, os produtos resultantes foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). O peso molecular da(s) banda(s) correspondente(s) ao genótipo homozigótico Val-Val é de 650pb; 650pb, 340pb e 310pb para o genótipo heterozigótico Val-Leu; e 340pb e 310pb para o genótipo homozigótico Leu-Leu (figura nº7).

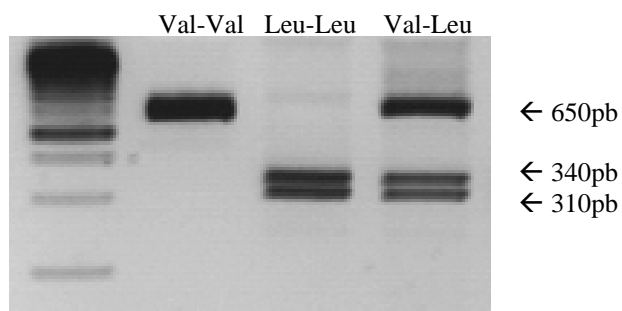


Figura nº6: Resultado do PCR-RFLP para o gene CYP1B1 em gel de agarose a 2%.

3.2.3.2. Determinação do genótipo do polimorfismo Ala²²⁵Val do Gene da MTHFR

3.2.3.2.1 Amplificação de ADN por PCR

Para um volume total de 50 µL, cada reacção de PCR foi preparada como no ponto 3.2.3.1.1 e os primers usados para amplificação do ADN do gene da MTHFR estão descritos na tabela nº4 (Semenza *et al.*; 2003).

Tabela nº4: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN do gene da MTHFR.

Primer	Sequência
Fol 1	5'-TGA AGGAGA AGG TGT CTG CGG GA-3'
Fol 2	5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

A amplificação do ADN foi efectuada no mesmo termociclador referido anteriormente. O programa de amplificação encontra-se resumido na tabela nº5.

Tabela nº5: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene da MTHFR.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	2 min	×1
94	30 s	×30
61	30 s	
72	1 min	
72	2 min	×1

Estas condições permitem a amplificação de fragmentos de 198pb. Cada fragmento de ADN foi analisado através de electroforese em gel de agarose a 2% (Seakem LE Agarose, BMA Rockland, ME USA), com tampão TAE corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Na figura nº8 pode ver-se a banda de 198pb observada através de uma lâmpada de ultravioleta, correspondente à região do gene MTHFR que se amplificou.

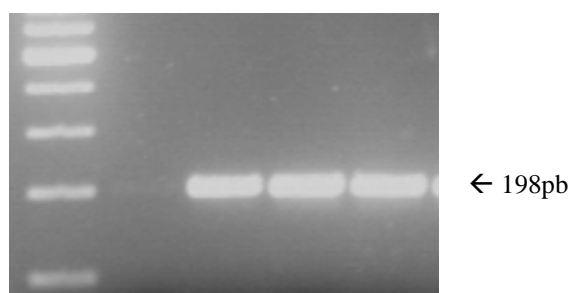


Figura nº7: Resultado da reacção de PCR do gene MTHFR em gel de agarose a 2%.

3.2.3.2.2 RFLP

O genótipo de cada amostra de ADN foi determinado através de uma digestão de 16 horas a 37 °C, usando como enzima de restrição a *HinfI*. A composição de cada reacção está referida na tabela nº6.

Tabela nº6: Composição da reacção de digestão usando a enzima de restrição *HinfI*, para determinação do genótipo do gene da *MTHFR*.

Reagentes	Volume (µL)
Produtos de PCR	20,0
H ₂ O estéril	24,5
Tampão R*	5,0
Enzima (<i>HinfI</i>)*	0,5

*Fermentas, Life Sciences

Após a digestão, os produtos resultantes foram analisados por electroforese em gel de agarose a 5%, com tampão TAE corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O peso molecular da(s) banda(s) correspondente(s) ao genótipo homozigótico wild type CC é de 198pb; 198pb, 175pb e 23pb para o genótipo heterozigótico CT; e 175pb e 23pb para o genótipo homozigótico TT (figura nº9). O fragmento de 23pb não é possível visualizar-se.

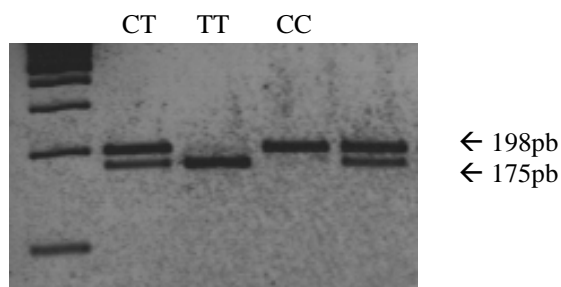


Figura nº8: Resultado do PCR-RFLP para o gene *MTHFR* em gel de agarose a 5%.

3.2.3.3 Determinação do genótipo do polimorfismo Val¹⁵⁸Met do Gene da COMT

3.2.3.3.1 Amplificação de ADN por PCR

Para um volume total de 50 µL adicionou-se 200 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada primer (metabion), 10 mM de dNTP's, 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e

1U de Taq Polymerase. As sequências dos primers usados para amplificação do ADN do gene da COMT estão descritas na tabela nº 7 (Lança *et al.*, 2001).

Tabela nº7: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN do gene da COMT.

Primer	Sequência
C ₁	5'-GCC CGC CTG CTG TCA CC-3'
C ₁₁	5'-CTG AGG GGC CTG GTG ATA GTG-3'

A amplificação dos fragmentos do gene da COMT foi efectuada no mesmo termociclador referido em pontos anteriores e o programa de amplificação encontra-se resumido na tabela nº8.

Tabela nº8: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene da COMT.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	2 min	×1
94	30 s	×30
59	30 s	
72	45 s	
72	2 min	×1

As condições usadas permitem a amplificação de fragmentos de ADN com 210pb. Os fragmentos de ADN foram analisados através de electroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TAE corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Na figura nº10, pode-se ver o tamanho da banda dos fragmentos amplificados.

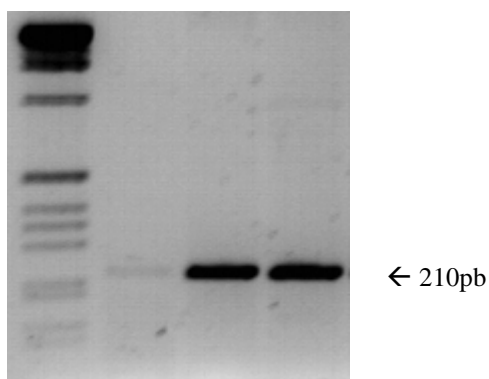


Figura nº9: Resultado da reacção de PCR do gene COMT em gel de agarose a 2%.

3.2.3.3.2 RFLP

Determinou-se o genótipo de cada amostra de ADN através de uma digestão a 37 °C durante 16 h, usando a enzima de restrição NlaIII. A composição de cada reacção está referida na tabela nº9.

Tabela nº9: Composição da reacção de digestão usando a enzima de restrição NlaIII, para determinação do genótipo do gene da COMT.

Reagentes	Volume (µL)
Produtos de PCR	22,0
Tampão G*	2,5
Enzima (NlaIII)*	0,5

*Fermentas, Life Sciences

Os produtos resultantes foram analisados por electroforese em gel de agarose a 5%, com tampão TAE corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O peso molecular da(s) banda(s) correspondente(s) ao genótipo homozigótico LL é de 114pb, 36pb e 35pb, para o genótipo heterozigótico HL é de 114pb, 96pb, 36pb, 35pb e 18pb, e para o genótipo homozigótico HH é de 96b, 36pb, 35pb e 18 pb (figura nº11). O fragmento de 18pb é por vezes de difícil visualização.

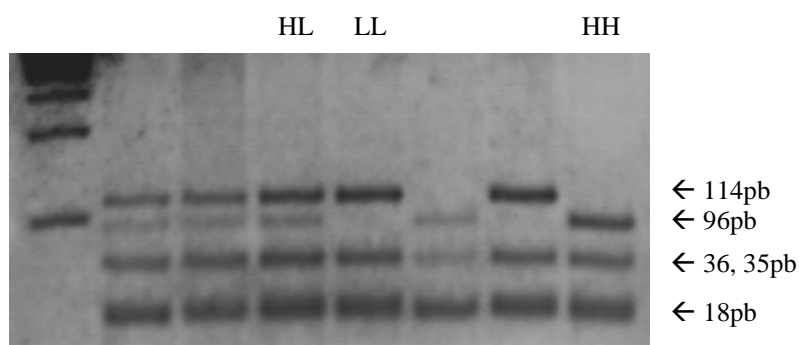


Figura nº10: Resultado do PCR-RFLP para o gene COMT em gel de agarose a 5%.

3.2.4 Análise do genótipo das mutações 185delAG, 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2, por PCR-RFLP

Para determinar a existência destas três mutações, procedeu-se à amplificação de ADN através de PCR, seguindo-se a digestão dos fragmentos de ADN por enzimas de restrição e a análise desses fragmentos por RFLP.

3.2.4.1 Amplificação de ADN por PCR

A composição de cada reacção de PCR foi idêntica para todas as mutações estudadas, com excepção da sequência de primers, isto é, usou-se um par de primers diferentes para cada mutação. Assim, para um volume total de 50 µL adicionou-se 200 ηg de ADN genómico, 10 pmol de cada primer (metabion), 10 mM de dNTP's, 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 1U de Taq Polymerase. Os primers usados para amplificação dos fragmentos de ADN pretendidos estão descritos na tabela nº 10 (^aAbeliovich *et al.*, 1997, ^bBacke *et al.*, 1999).

Tabela nº10: Sequência dos primers usados para amplificação de ADN para as 3 mutações estudadas nos genes de susceptibilidade do cancro da mama (BRCA1/2).

Mutação	Primers	Tamanho do fragmento (pb)	
		<i>wild type</i>	mutação
185delAG ^a	5'-GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT-3' 5'-TCA CTT ACC AGA TGG GAG AC-3'	170	168
5382insC ^b	5'-CCA AAG CGA GCA AGA GAA TCT C-3' 5'-GGG AAT CCA AAT TAC ACA GC-3'	270	270
6174delT ^a	5'-TGG GAT TTT TAG CAC AGC ACG-3' 5'-CTG GTC TGA ATG TTC GTT AC-3'	148	147

A amplificação dos fragmentos de ADN, correspondente à localização de cada uma das três mutações nos genes BRCA1/2, foi efectuada num termociclador, onde se incluiu sempre um controlo negativo. As condições dos programas estão resumidas nas tabelas nº11 e 12.

Tabela nº11: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene BRCA1 e BRCA2 correspondentes às mutações 185delAG e 6174delT, respectivamente.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	3 min	×1
94	30 s	×30
55	30 s	
72	30 s	
72	10 min	×1

Tabela nº12: Programa de PCR usado para amplificação de fragmentos de ADN do gene BRCA1 correspondente à mutação 5382insC.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	3 min	×1
94	30 s	×30
61	30 s	
72	30 s	
72	5 min	×1

A amplificação de cada fragmento de ADN foi confirmada por electroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O tampão usado na preparação do gel foi o TAE, sendo este também o tampão de electroforese. Aplicaram-se 10 µL de cada produto de PCR no gel após a mistura com 1 µL de tampão de aplicação (Loading Buffer, Takara Bio Inc.). Os géis foram observados com uma lâmpada de luz ultra-violeta, figura. nº12.

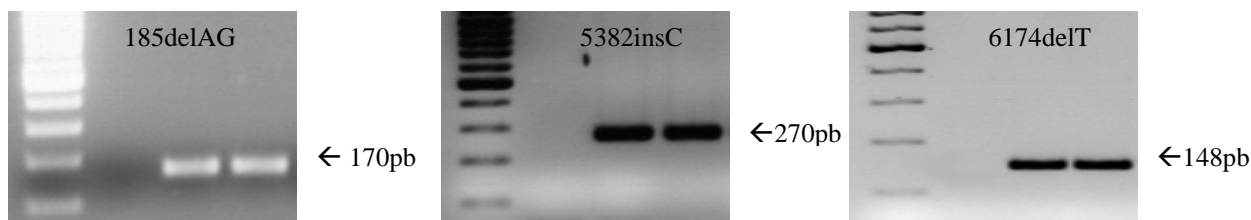


Figura nº11: Resultado da reacção de PCR para os genes BRCA1 e BRCA2 em gel de agarose a 2%.

3.2.4.2 RFLP

A presença e/ou ausência de mutações foi determinada por meio de uma digestão a 37°C durante 16 horas. Foram usadas 3 enzimas de restrição diferentes. Para a mutação 185delAG usou-se a *HinfI*, para a mutação 5382insC usou-se a *DdeI* e para a mutação 6174delT usou-se a *BbrPI*. A composição de cada reacção de digestão para determinar a presença de cada uma das mutações estudadas encontra-se referida na tabela nº13.

Tabela nº13: Composição de cada reacção de digestão usando a enzima de restrição específica para determinação da presença das mutações em estudo nos genes BRCA1/2.

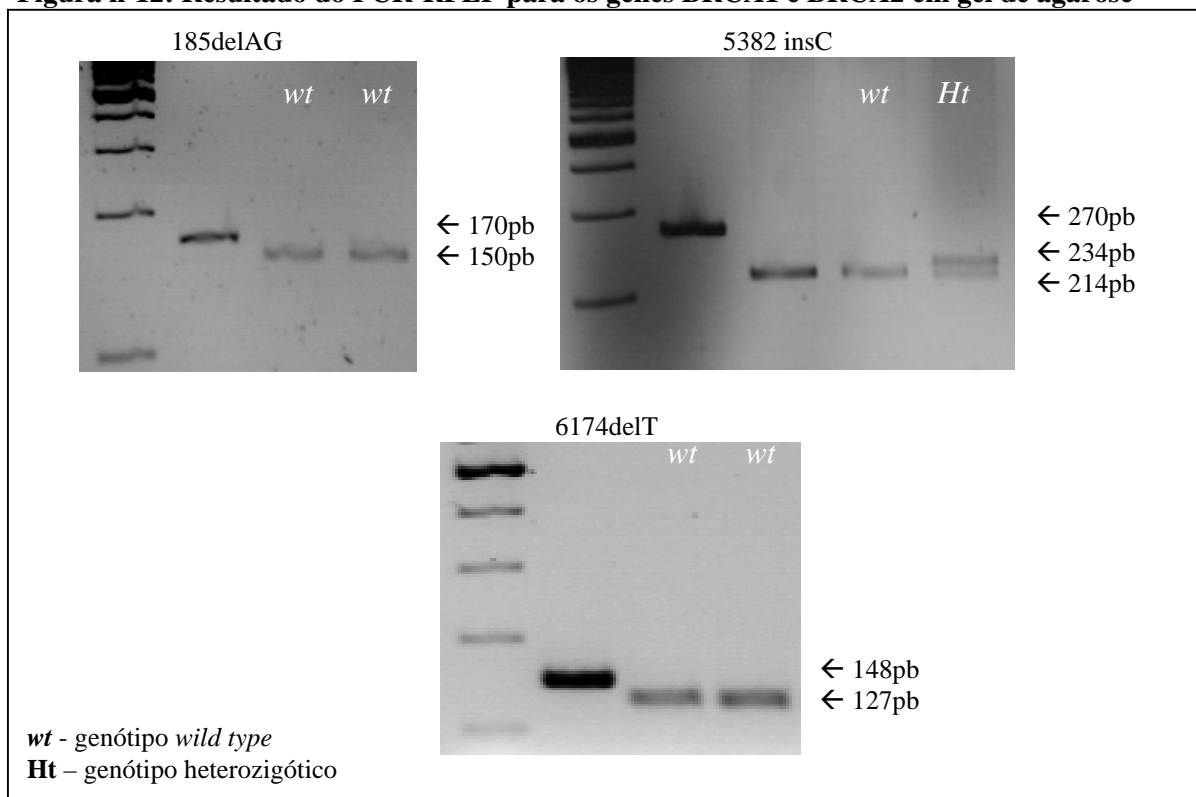
Mutação	Reagentes	Volume (µL)
185delAG	Produtos de PCR	20,0
	H ₂ O	24,5
	Tampão R*	5,0
	Enzima (<i>HinfI</i>)*	0,5
5382insC	Produtos de PCR	20,0
	H ₂ O	24,5
	Tampão Tango*	5,0
	Enzima (<i>DdeI</i>)*	0,5
6174delT	Produtos de PCR	20,0
	H ₂ O	24,5
	Tampão Tango*	5,0
	Enzima (<i>BbrPI</i>)*	0,5

*Fermentas, Life Sciences

Os produtos resultantes foram analisados por electroforese em gel de agarose a 5%, com tampão TAE corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A sequência de primers escolhida para determinar a presença destas mutações, permite que as enzimas de restrição escolhidas apenas façam a digestão dos fragmentos correspondentes ao genótipo *wild type* de cada mutação. Assim, através das imagens obtidas por luz ultravioleta para cada gel de agarose, foi possível determinar a presença ou ausência destas mutações, figura nº13. O peso molecular da(s) banda(s) correspondente(s) ao genótipo homocigótico *wild type* para a mutação 185delAG é de 150pb e 20pb, para a

mutação 5382insC é de 214pb, 36pb e 20pb, e para a mutação 6174delT é de 127pb e 21 pb.

Figura nº12: Resultado do PCR-RFLP para os genes BRCA1 e BRCA2 em gel de agarose



a 5%.

3.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi efectuada através do programa SAS (SAS, 1989: Institute Inc. SAS/STAT User's Guide, Versão 6, 4ª edição, volume 1, Cary, NC. SAS Institute Inc.).

A Tabela nº 14 apresenta o número de mulheres com cancro da mama e saudáveis distribuídas pelos genótipos estudados.

Tabela nº14: Distribuição por genótipo das mulheres que integraram o estudo.

	Genes								
	CYP1B1			MTHFR			COMT		
	LL	VL	VV	TT	CT	CC	LL	HL	HH
Mulheres com cancro da mama	9	13	7	3	16	13	13	12	7
Mulheres saudáveis	3	26	1	2	16	12	9	16	5

As diferentes variáveis (mulheres com cancro da mama versus mulheres saudáveis para cada genótipo e em todas as combinações de 2 e 3 genótipos) foram analisadas em tabelas de contingência 2×2 e utilizou-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2) para determinar o grau de associação entre elas. A ausência de associação só foi considerada quando a significância estatística foi inferior a $P < 0,05$.

Este trabalho compreende também um estudo do tipo caso-controlo para avaliar o risco para o cancro da mama associado a cada um dos genótipos da CYP1B1, da MTHFR e da COMT, foi calculado o valor de *Odds Ratio* (OR) com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%). O valor de OR num estudo deste tipo indica a magnitude do risco relativo associado a cada genótipo.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada foi analisado pelo teste do χ^2 . Para esta análise assumiu-se que:

Mulheres com menos de 50 anos – geração seguinte

Mulheres com mais de 50 anos – geração inicial

4 Apresentação e Discussão dos Resultados

4 Apresentação e discussão dos resultados

4.1 Distribuição por frequências dos genótipos para a CYP1B1 Val⁴³²Leu

Das 32 mulheres que constituem a população de mulheres com cancro da mama apenas se conseguiu determinar os genótipos para o gene da CYP1B1 em 29. Na literatura estão descritos vários polimorfismos para o gene CYP1B1. O polimorfismo Val⁴³²Leu no gene CYP1B1 localiza-se no codão 432 do exão 3, neste exão estão descritos polimorfismos para mutações no codão 449 e codão 453. Dada a proximidade que existe entre estes codões, pode existir interferência com os locais de ligação dos primers utilizados para o estudo do polimorfismo Val⁴³²Leu do gene CYP1B1

A distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu para a população de mulheres saudáveis (n=30) e população de mulheres com cancro da mama (n=29) encontra-se descrita na tabela nº15.

A diferença para a distribuição por frequências dos genótipos do gene CYP1B1 para a população MS e para a população MCM é estatisticamente significativa.

Existem mais mulheres com o genótipo heterozigótico Val-Leu na população MS (86,67%) do que na população MCM (44,83%), pelo contrário encontra-se maior número de mulheres MCM com genótipo homozigótico Leu-Leu e Val-Val. A análise dos resultados pelo teste do χ^2 indica que a diminuição do número de mulheres que apresentam o genótipo heterozigótico (VL) constitui um factor de risco, mais do que a presença de mulheres com genótipos homozigóticos (OR=8,000; IC 95% 2,2197 – 28,8327). Considerando que o valor de OR indica o risco relativo de determinado acontecimento podemos considerar que as mulheres com genótipo heterozigótico (VL) para a enzima CYP1B1 têm 8 vezes menos risco de desenvolver cancro da mama.

Tabela nº15: População de mulheres com cancro da mama vs População saudável: distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu.

	Mulheres saudáveis (n=30)		Mulheres com cancro da mama (n=29)		Odds Ratio	IC 95%	P
	n	%	n	%			
Genótipo							
VV	1	3,33	7	24,14	0,1084	0,0124 – 0,9466	0,0257*
VL	26	86,67	13	44,83	8,0000	2,2197 – 28,8327	0,0007*
LL	3	10,00	9	31,03	0,2469	0,0592 – 1,0306	0,0448*

* Significativo para P<0,05

Apresentação e Discussão dos Resultados

Num estudo do tipo caso-controlo, Kocabas *et al.* indicou que as mulheres portadoras do genótipo VV teriam um risco aumentado para o cancro da mama, o que está de acordo com os nossos resultados para a população de mulheres MCM (OR=0,1084; IC 95% 0,0124-0,9466). O valor de OR para o genótipo VV foi calculado pelo teste exacto de Fisher para validação dos resultados, uma vez que apenas uma mulher da população MS era portadora deste genótipo.

No trabalho realizado por Bailey *et al.*, o autor refere que as mulheres Caucásicas portadoras do genótipo VV tinham maior percentagem de cancro da mama que era REs⁺ e RPs⁺, sugerindo que este polimorfismo pode ser importante para a expressão destes receptores esteróides no cancro da mama (Zheng *et al.*, 2000). No presente estudo não se analisou a relação deste parâmetro com a presença ou ausência de REs e RPs.

Actualmente é referido que a exposição prolongada aos estrogénios é um factor determinante para os cancros hormono-dependente. Até ao momento, na literatura têm sido consideradas duas hipóteses para explicar a etiologia deste tipo de cancro. A primeira refere que o cancro hormono-dependente pode desenvolver-se devido à ocorrência de mutações espontâneas como resultado do aumento da proliferação celular associada ao aumento dos níveis de estrogénios. A segunda hipótese refere que este tipo de cancros ocorre devido aos efeitos genotóxicos dos metabolitos da CYP1B1, como o 4-hidroxiestradiol. Ambas as hipóteses não são mutuamente exclusivas e podem contribuir significativamente para a etiologia deste tipo de neoplasia.

A CYP1B1 é expressa em maior quantidade nos tumores da mama, sendo a responsável pela formação de 4-hidroxiestradiol, um metabolito carcinogénico com actividade estrogénica. Além disto, a CYP1B1 parece também estar implicada na activação metabólica de um variado número de carcinogénios ambientais, tais como, arilaminas, aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Foi demonstrado que a substituição de uma leucina por uma valina aumenta a actividade da enzima numa variedade de substratos, que incluem procarcinogénios e as hormonas esteróides produzidas nas gónadas. O aumento da formação de 4-hidroxiestradiol induzido pela CYP1B1 pode ser um possível factor de risco para o cancro da mama. Segundo Parachini *et al.*, as mulheres portadoras do genótipo homozigótico para a leucina têm uma maior concentração de 2-hidroxiestrone e 16-hidroxiestrone no plasma que as

Apresentação e Discussão dos Resultados

mulheres portadoras dos outros genótipos da CYP1B1, pelo que apresentam um risco mais baixo para o cancro da mama, pois estes metabolitos não têm associados efeitos carcinogénicos.

A análise da distribuição por frequências dos alelos V e L dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu pode ser observada na tabela nº16.

Tabela nº16: Distribuição por frequências dos alelos V e L dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu.

Alelos	Mulheres saudáveis (n=30)		Mulheres com cancro da mama (n=29)	
	n	%	n	%
V	28	46,67	27	46,55
L	32	53,33	31	53,45

Verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição por frequências dos alelos V e L.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg afirma que para uma população mendeliana, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes de uma geração para a outra. Quando se analisou o equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações MS e MCM verificou-se que a distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1, em ambas as populações está de acordo com o esperado, segundo os princípios deste equilíbrio ($P=0,7083$ para a diferença de gerações na população MS e $P=0,1359$ para a mesma diferença na população MCM). Na tabela nº17, encontra-se a distribuição por genótipo para CYP1B1 Val⁴³²Leu para a geração inicial (mulheres com mais de 50 anos) e geração seguinte (mulheres com menos de 50 anos), na população MS versus população MCM.

Apresentação e Discussão dos Resultados

Tabela nº17: Distribuição por genótipo para CYP1B1 Val⁴³²Leu nas mulheres da população MS e MCM, na geração inicial e geração seguinte.

	Mulheres saudáveis			Mulheres com cancro da mama		
	LL (n=3)	VL (n=26)	VV (n=1)	LL (n=9)	VL (n=13)	VV (n=7)
Geração inicial	2	9	0	4	8	1
Geração seguinte	1	17	1	5	5	6

4.2 Distribuição por frequências dos genótipos para a MTHFR Ala²²⁵Val

A distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val para a população de mulheres saudáveis (n=30) e população de mulheres com cancro da mama (n=32) encontra-se descrita na tabela nº18.

Na população MS podemos observar uma frequência de 40,0% para o genótipo CC, 53,33% para o genótipo CT e 6,67% para o genótipo TT. Relativamente à população MCM, observamos uma frequência de 40,62% para o genótipo CC, 50,00% para o genótipo CT e 9,38% para o genótipo TT.

Não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas populações para os diferentes genótipos do gene MTHFR.

Existem poucos estudos que avaliem a associação entre o polimorfismo MTHFR Ala²²⁵Val e o risco para o cancro da mama e os resultados que apresentam são controversos. No presente trabalho as frequências alélicas e genotípicas do gene MTHFR são semelhantes entre as duas populações estudadas (MCM e MS), pelo que parece não haver associação entre o polimorfismo MTHFR Ala²²⁵Val e o risco para o cancro da mama. Este resultado está em desacordo com um estudo prévio efectuado por Gershoni-Baruch *et al.*, no qual o autor verificou que o genótipo homozigótico TT se encontrava associado de forma estatisticamente significativa com um diagnóstico de cancro da mama bilateral ou com cancro da mama e do ovário simultaneamente, numa população de mulheres de origem judaica. Outro estudo efectuado por Sharp *et al.*, revelou não haver diferença estatisticamente significativa nas distribuições dos genótipos para MTHFR numa população de mulheres escocesas com cancro da mama, num estudo do tipo caso-controlo.

Tabela nº18: População de mulheres com cancro da mama vs População saudável: distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val.

	Mulheres saudáveis (n=30)		Mulheres com cancro da mama (n=32)		Odds Ratio	IC 95%	P
	n	%	n	%			
Genótipo							
CC	12	40,00	13	40,62	0,9744	0,3529 – 2,6899	0,9600
CT	16	53,33	16	50,00	1,1429	0,4216 – 3,0983	0,7930
TT	2	6,67	3	9,38	0,6905	0,1072 – 4,4489	0,6955

* Significativo para P<0,05

Apresentação e Discussão dos Resultados

Os resultados de Campbell *et al.*, sugerem que a baixa actividade da MTHFR associada ao genótipo TT, aumenta o risco para o cancro da mama. Segundo Shrubsole *et al.*, existe uma associação entre o consumo de folato e o risco para o cancro da mama, pois entre as mulheres com um consumo elevado de folato o risco diminui. O baixo consumo de folato está associado a uma deficiente incorporação das bases de uracilo na cadeia de ARN e a quebras nos cromossomas, bem como à metilação aberrante do ADN. É possível que as mulheres portadoras do genótipo TT sejam particularmente susceptíveis aos efeitos carcinogénicos associados a uma insuficiência dos níveis de folato. O genótipo TT na presença de uma baixa concentração de folato está associado a um aumento dos níveis de homocisteína, a uma diminuição do número de folatos metilados e, portanto, a reduções na metilação do ADN genómico.

A acumulação de homocisteína pode representar outro mecanismo para explicar o aumento do risco. Nos portadores do genótipo TT, a baixa actividade da enzima MTHFR juntamente com a reduzida remetilação da homocisteína em metionina, leva ao aumento dos níveis de homocisteína, para os quais foi demonstrado, em modelos experimentais, que promoviam o crescimento de células tumorais (Jakubowska *et al.*, 2007). Assim, o efeito da MTHFR no risco para o cancro da mama numa população em particular pode depender dos níveis de consumo de folato dessa população. Neste trabalho não foram obtidos dados relativos à concentração sérica de folato na população em estudo e, portanto, não se pode estabelecer qualquer relação.

A análise da distribuição por frequências dos alelos C e T dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val pode ser observada na tabela nº19.

Tabela nº19: Distribuição por frequências dos alelos C e T dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val.

Alelos	Mulheres saudáveis (n=30)		Mulheres com cancro da mama (n=32)	
	n	%	n	%
C	40	66,67	42	65,62
T	20	33,33	22	34,38

Apresentação e Discussão dos Resultados

Verifica-se que a distribuição por frequências dos alelos C e T não tem diferença estatisticamente significativa nas populações estudadas.

A distribuição das frequências por genótipo de ambas as populações está de acordo com os princípios de Hardy-Weinberg para populações em equilíbrio ($P=0,6121$ para a diferença de gerações na população MS e $P=0,8666$ para a mesma diferença na população MCM). Na tabela nº20, encontra-se a distribuição por genótipo para MTHFR Ala²²⁵Val para a geração inicial e geração seguinte, na população MS versus população MCM.

Tabela nº20: Distribuição por genótipo para MTHFR Ala²²⁵Val nas mulheres da população MS e MCM, na geração inicial e geração seguinte.

	Mulheres saudáveis			Mulheres com cancro da mama		
	CC (n=12)	CT (n=16)	TT (n=2)	CC (n=13)	CT (n=16)	TT (n=3)
Geração inicial	4	7	0	6	8	1
Geração seguinte	8	9	2	7	8	2

4.3 Distribuição por frequências dos genótipos para a COMT Val¹⁵⁸Met

A distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met para a população de mulheres saudáveis (n=30) e população de mulheres com cancro da mama (n=32) encontra-se descrita na tabela nº21.

Não se verificou diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos do gene da COMT para as diferentes populações estudadas.

Os resultados mostram que existem mais mulheres com o genótipo heterozigótico HL na população MS (53,33%) do que na população MCM (37,50%). Em relação ao genótipo homozigótico LL, o que se verifica é que a sua presença é maior na população MCM (40,62%) do que na população MS (30,00%). O mesmo acontece com o genótipo HH, está mais presente nas mulheres da população MCM (21,88%) do que nas mulheres da população MS (16,67 %).

A COMT é uma enzima de fase II que está implicada na inactivação do catecol estrogénio através da transferência de um grupo metilo. O catecol estrogénio pode também ser metabolizado em quinonas e semiquinonas, as quais possuem propriedades carcinogénicas e entram no ciclo redox produzindo espécies reactivas de oxigénio responsáveis pela indução de lesões no ADN. A COMT cataliza a metilação do catecol estrogénio em 2-metoxiestradiol e/ ou 4-metoxiestradiol, diminuindo o potencial efeito carcinogénico destes metabolitos. De facto, é referido na literatura que o 2-metaxiestradiol parece mesmo inibir o crescimento tumoral. A presença de uma metionina na posição 108/158 do gene da COMT, designada por COMT-L (low activity) está associada a uma diminuição da actividade da enzima e conseqüentemente ao aumento de catecol estrogénio no ambiente celular.

Tabela nº21: População de mulheres com cancro da mama vs População saudável: distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸ Met.

Genótipo	Mulheres saudáveis (n=30)		Mulheres com cancro da mama (n=32)		Odds Ratio	IC 95%	P
	n	%	n	%			
	HH	5	16,67	7			
HL	16	53,33	12	37,50	1,9048	0,6915 – 5,2467	0,2106
LL	9	30,00	13	40,62	0,6264	0,2187 – 1,7942	0,3822

* Significativo para P<0,05

Apresentação e Discussão dos Resultados

Neste estudo não se verificou qualquer associação entre os diferentes genótipos para a COMT e o risco para o cancro da mama, $P > 0,05$, tabela nº21. Esta ausência de associação também foi observada por Kocabas *et al.*, num estudo populacional de grandes dimensões. Apesar dos resultados não terem significado estatístico, verifica-se que, mesmo assim, na população MCM existe uma maior frequência do genótipo LL do que na população MS.

A distribuição por frequências dos alelos H e L dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met é diferente entre as duas populações estudadas, pois verifica-se que na população MS o alelo L está menos presente, enquanto o alelo H está mais presente, como se pode ver na tabela nº22.

Tabela nº22: Distribuição por frequências dos alelos H e L dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met.

Alelos	Mulheres saudáveis (n=30)		Mulheres com cancro da mama (n=32)	
	n	%	n	%
H	26	43,33	26	40,62
L	34	56,67	38	59,38

A análise do equilíbrio de Hardy –Weinberg indicou que existe um desequilíbrio entre as populações estudadas, uma vez que na população MS, P é igual a 0,0314 para a diferença de gerações, enquanto que na população MCM, P para a diferença de gerações é igual a 0,2851. O desequilíbrio verificado na população MS pode indicar que esta população não é representativa da população geral. Num estudo efectuado por Lavigne *et al.*, a frequência do genótipo LL para COMT era de 25% para as mulheres Caucasianas, neste estudo verifica-se uma frequência de 30%, ligeiramente superior. Na tabela nº23, encontra-se a distribuição por genótipo para COMT Val¹⁵⁸Met na geração inicial e geração seguinte, na população MS versus população MCM.

Apresentação e Discussão dos Resultados

Tabela nº23: Distribuição por genótipo para COMT Val¹⁵⁸Met nas mulheres da população MS e MCM, na geração inicial e geração seguinte.

	Mulheres saudáveis			Mulheres com cancro da mama		
	LL (n=9)	HL (n=16)	HH (n=5)	LL (n=13)	HL (n=12)	HH (n=7)
Geração inicial	1	6	4	6	4	5
Geração seguinte	8	10	1	7	8	2

Na população Caucasiana estima-se que a frequência do alelo L varia entre os 49% e os 63%, sendo significativamente mais alta que a frequência verificada para as populações asiáticas, 24% a 33%. Assim no mundo inteiro as frequências do alelo L e do genótipo LL variam consoante o grupo étnico.

No nosso estudo, toda a população estudada tem maior frequência do genótipo LL do que o que seria de esperar para uma população Caucasiana, o que pode ser uma característica da população da Beira Interior.

4.4. Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu versus idade

Foi efectuada uma categorização da idade em dois grupos: o primeiro inclui as mulheres das populações MS e MCM com idade inferior a 50 anos e o segundo inclui as mulheres das populações MS e MCM com idade igual ou superior a 50 anos. Inicialmente, também se efectuou a análise estatística considerando o grupo de mulheres pré-menopáusicas e pós-menopáusicas (resultados não mostrados) e como os resultados obtidos foram coincidentes com a análise efectuada por idades, podemos considerar abaixo dos 50 anos pré-menopausa e acima dos 50 anos pós-menopausa.

Tabela nº24: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama: distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu para idade inferior a 50 anos.

Genótipo	Mulheres saudáveis (n=30)	Mulheres com cancro da mama (n=29)	Odds Ratio	IC 95%	P
	<50 Anos				
LL	3,33%	17,24%	0,1222	0,0126 – 1,1881	0,0728
VL	56,67%	17,24%	18,7000	3,0704 – 113,8904	0,0004*
VV	3,33%	20,69%	0,0926	0,0097 – 0,8818	0,0318*

* Significativo para P<0,05

No grupo de mulheres com idade inferior a 50 anos existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu entre as duas populações. O aumento do genótipo heterozigótico descrito no ponto 4.1 é evidenciado no grupo de mulheres pré-menopáusicas. A presença do genótipo heterozigótico VL para CYP1B1 na população MS com idade inferior a 50 anos parece conferir um risco 18 vezes menor para o cancro da mama (OR=18,7000; IC 95% 3,0704 – 113,8904), tabela nº24. Também se verifica um aumento do risco para o cancro da mama nas mulheres pré-menopáusicas com genótipo VV da população MCM (OR=0,0926; IC 95% 0,0097-0,8818). No gráfico nº1, encontra-se representada a

Apresentação e Discussão dos Resultados

distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu nas mulheres com menos de 50 anos das duas populações estudadas.

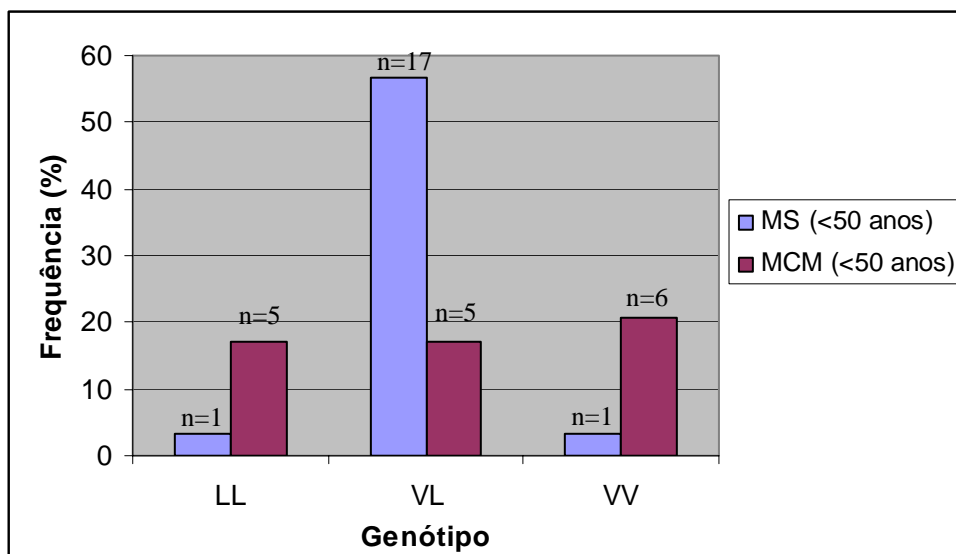


Gráfico nº1: Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade inferior a 50 anos.

Segundo Paracchini *et al.*, o risco para o cancro da mama parece ser maior para a classe de idades entre os 45 anos e os 59 anos, enquanto que para mulheres muito jovens ou muito velhas é mais baixo. Uma possível explicação para este facto pode envolver a alteração dos níveis de estrogénios e, portanto, as alterações no metabolismo dos estrogénios que ocorrem próximo da menopausa. A actividade da CYP1B1 é diferente consoante, se trate de mulheres pré-menopáusicas ou pós-menopáusicas, uma vez que os níveis de estrogénios em circulação e nos tecidos diferem nestas mulheres.

A distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu na população de mulheres saudáveis e população de mulheres com cancro da mama com idade superior a 50 anos encontra-se na tabela nº25.

Tabela nº25: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama: distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu para idade superior a 50 anos.

Genótipo	Mulheres saudáveis (n=30)	Mulheres com cancro da mama (n=29)	Odds Ratio	IC 95%	P
	>50 Anos				
LL	6,67%	13,79%	0,5000	0,0724 – 3,4536	0,4780
VL	30,0%	27,59%	2,8125	0,4222 – 18,7350	0,2761
VV	0%	3,49%	--	--	0,5417

Neste caso, para idades iguais ou superiores a 50 anos não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre a população MS e população MCM, considerando todos os genótipos. No gráfico nº2, está representada a distribuição por frequências para CYP1B1 Val⁴³²Leu para as duas populações com idade acima dos 50 anos.

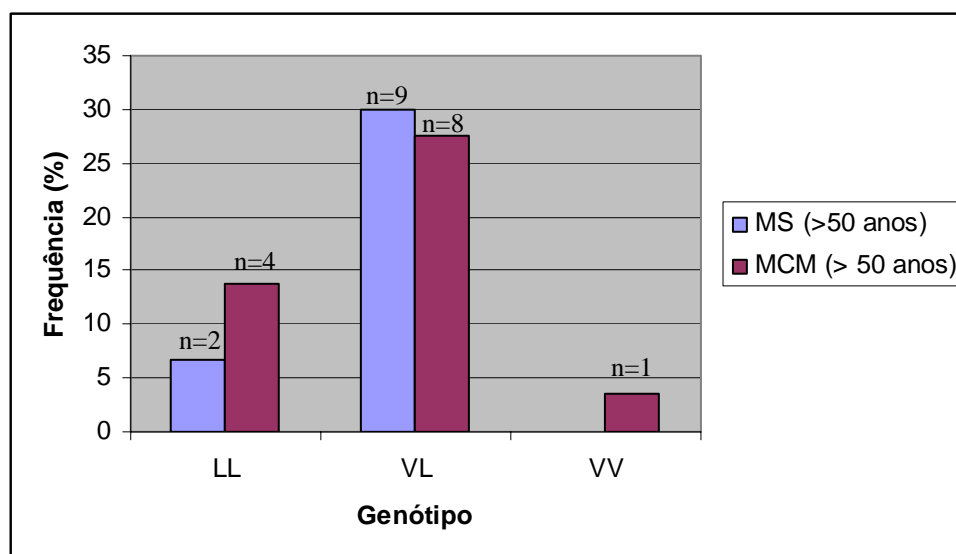


Gráfico nº2: Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade superior a 50 anos.

Zheng *et al.*, observou uma associação entre o genótipo LL para CYP1B1 e o aumento do risco para a doença em mulheres chinesas pós-menopáusicas, este resultado não é verificado no nosso estudo. O estudo efectuado por Le Marchand *et al.*, demonstrou não

Apresentação e Discussão dos Resultados

haver associação entre o genótipo VV e o risco para a doença numa amostra de mulheres pós-menopáusicas. No nosso estudo ao contrário deste autor, a associação entre o genótipo VV e o risco de cancro da mama parece significativo para as mulheres pré-menopáusicas, aliás as diferenças de distribuição por frequência dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu parecem no geral ter significado estatístico apenas para as mulheres pré-menopáusicas, gráfico nº3.

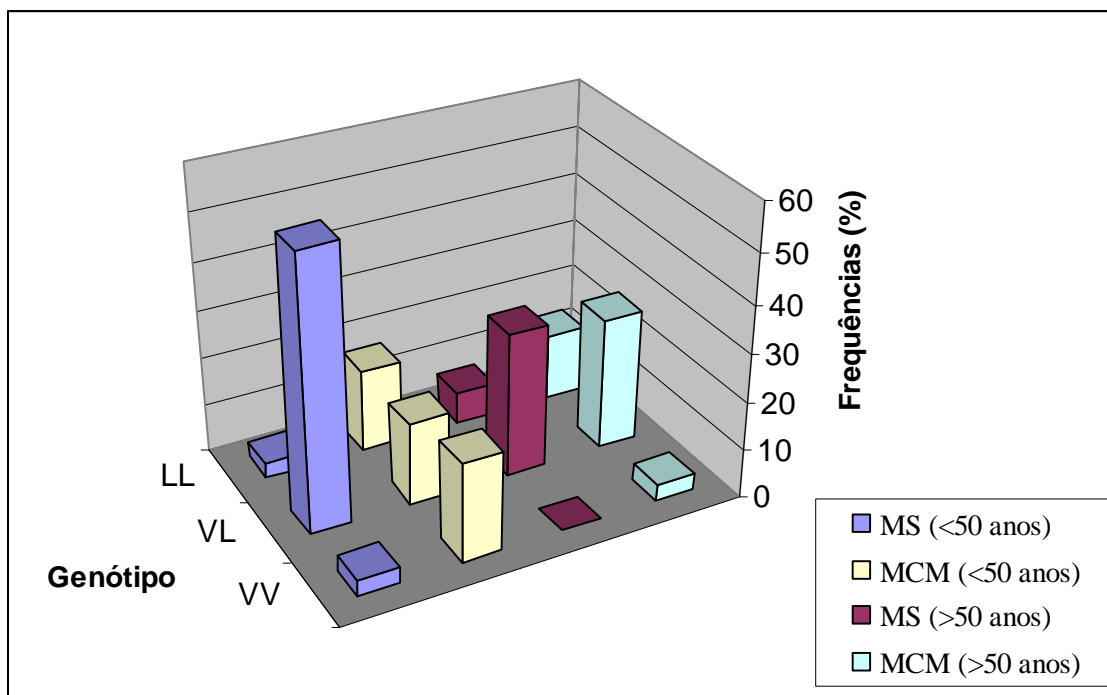


Gráfico nº3: Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama.

4.5. Distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val versus idade

A análise da distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres MS e população de mulheres MCM com idades inferiores a 50 anos está representada no gráfico n°4. Não existe diferença estatisticamente significativa entre as duas populações, MS e MCM.

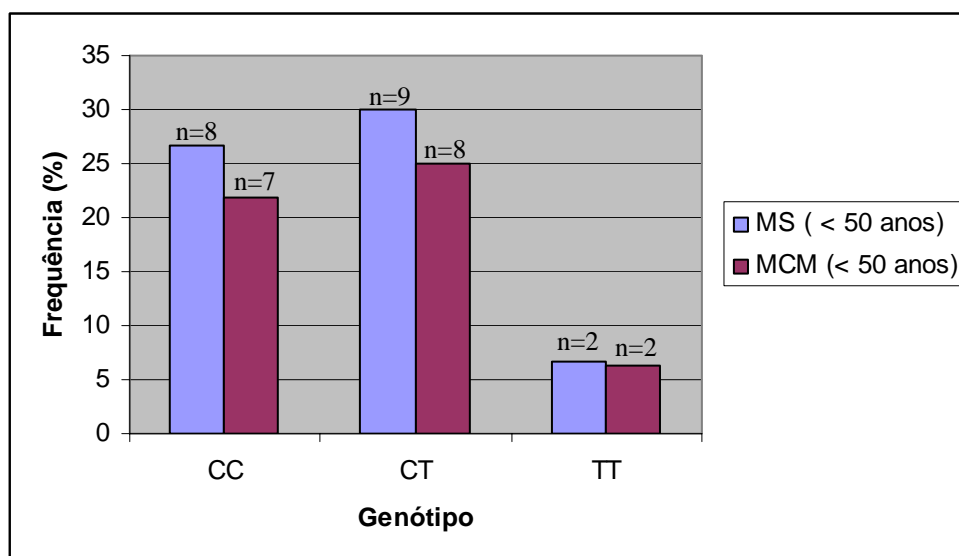


Gráfico n°4: Distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade inferior a 50 anos.

A distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres MS e MCM com idades superiores a 50 anos está representada no gráfico n°5. Também neste caso, não se verifica nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as duas populações.

Ao contrário do nosso estudo, um trabalho realizado por Semenza *et al.*, demonstrou que os genótipos da MTHFR não diferiam nas mulheres em pós-menopausa com cancro da mama, no entanto, para um subgrupo de mulheres em pré-menopausa encontrou associação entre o genótipo TT e o risco de cancro da mama.

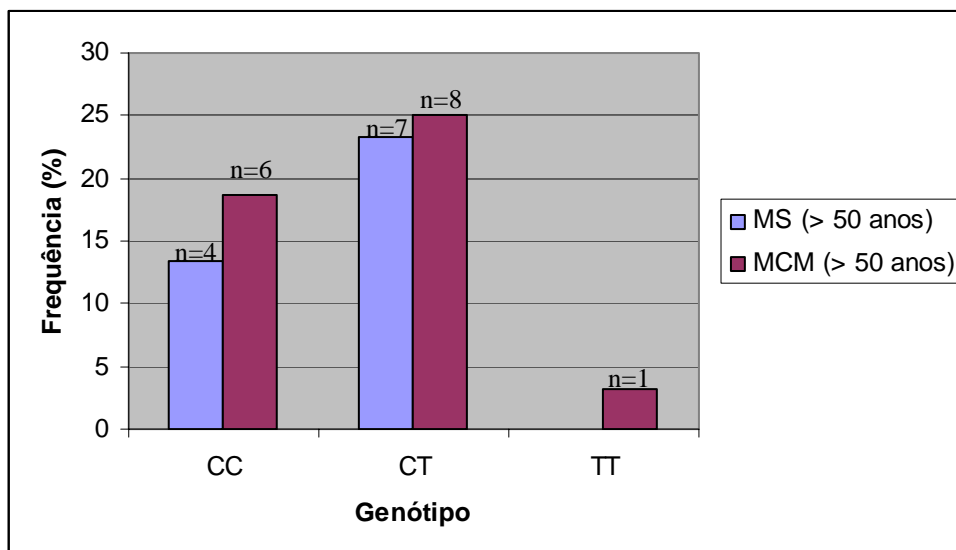


Gráfico n°5: Distribuição por frequências dos genótipos para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade superior a 50 anos.

Contudo para outros autores as mulheres pós-menopáusicas, portadoras do genótipo TT são candidatas à utilização da terapia hormonal de substituição. O trabalho desenvolvido por Le Marchand *et al.*, mostrou uma associação inversa entre o genótipo TT e o cancro da mama em mulheres pós-menopáusicas com uma terapêutica de THS. Uma vez que os resultados dos estudos clínicos são tão divergentes permanece ainda por esclarecer se existe ou não uma associação entre os efeitos dos estrogénios e o folato no cancro da mama.

4.6. Distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met versus idade

A distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres MS e população de mulheres MCM com idades inferiores a 50 anos está representada no gráfico nº6.

O estudo efectuado por Thompson *et al.*, indicou que o alelo L estava associado a um aumento do risco para o cancro da mama nas mulheres pré-menopáusicas, pelo contrário no nosso estudo parece não haver associação entre o genótipo LL e o risco de doença nas mulheres pré-menopáusicas, pois não se verifica nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as duas populações.

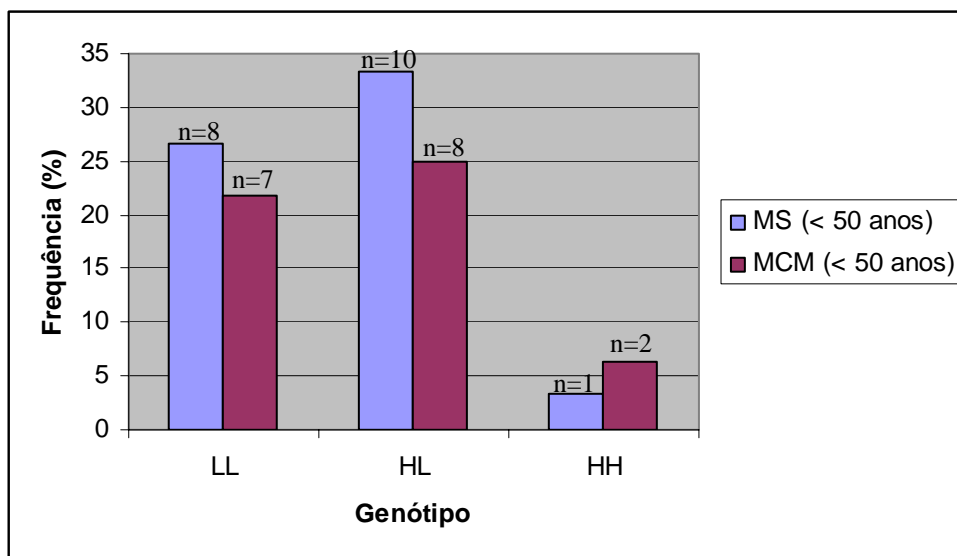


Gráfico nº6: Distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade inferior a 50 anos.

A distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres MS e MCM com idade superior a 50 anos está representada no gráfico nº7.

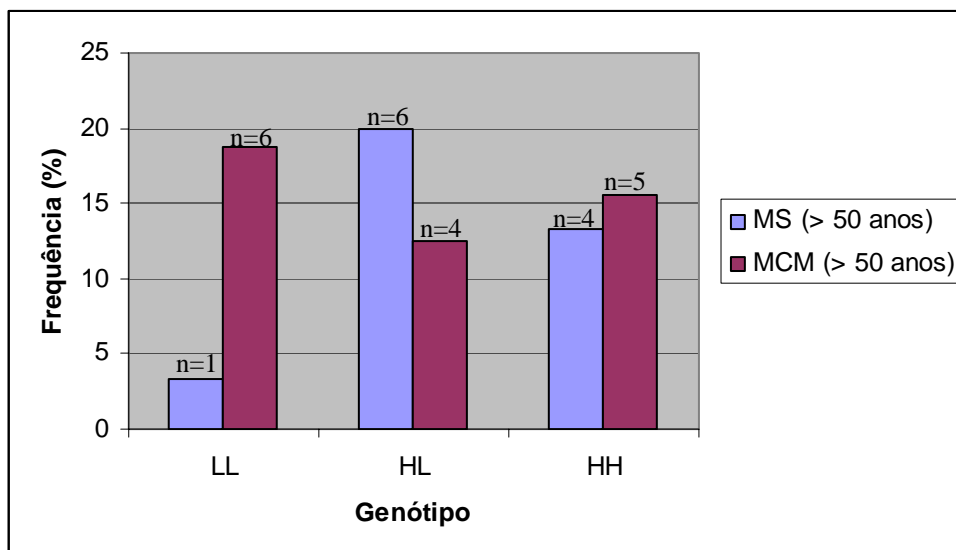


Gráfico nº7: Distribuição por frequências dos genótipos para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama para idade superior a 50 anos.

Verifica-se que na população MS há uma diminuição do genótipo LL e um aumento do genótipo HH nas mulheres pós-menopáusicas. Em relação às mulheres da população MCM observa-se um menor número de mulheres com genótipo heterozigótico (HL) e um maior número de mulheres com genótipo homozigótico HH, o que em termos de metabolismo de estrogénios se traduz numa degradação mais eficiente do catecol estrogénio que é sintetizado pela enzima CYP1B1, nomeadamente o 4-hidroxiestradiol.

O estudo realizado por Huang *et al.*, revelou uma associação positiva nas mulheres Tailandesas em pós-menopausa portadoras do genótipo LL e o risco de cancro da mama. Modugno *et al.*, também observou um aumento do risco associado ao genótipo LL nas mulheres com idade superior a 50 anos, contudo, o autor não obteve resultados estatisticamente significativos. No nosso estudo também verificámos uma associação entre o genótipo LL e o risco de cancro da mama nas mulheres pós-menopáusicas.

4.7 Distribuição por frequências dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met versus história familiar na população de mulheres com cancro da mama

A história familiar foi definida pela presença de casos de cancro da mama e/ ou do ovário nos familiares directos. Na população MS nenhuma mulher tem história familiar de doença.

A análise dos resultados não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres da população MCM com história familiar e as mulheres da mesma população sem história familiar, para todos os genes estudados.

4.8 Distribuição por frequências para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met

Nos últimos anos, os trabalhos científicos realizados têm procurado identificar factores de risco para o cancro da mama. Os polimorfismos genéticos que afectam a expressão ou a actividade de produtos de genes envolvidos no metabolismo dos estrogénios podem constituir um factor de risco para a doença.

Na combinação do genótipo VL para CYP1B1 e LL para COMT, verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre a população MS e a população MCM, tabela nº26.

Tabela nº26: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e LL para COMT Val¹⁵⁸Met.

Genótipo	MS (n=30)	MCM (n=32)	Odds Ratio	IC 95%	P
CYP1B1 VL vs COMT LL	26,67%	6,25%	5,4545	1,0536 – 28,2390	0,0400*

* Significativo para P<0,05

Os resultados estatísticos da tabela nº26 foram obtidos pelo teste exacto de Fisher. Verifica-se que a combinação destes dois genótipos indica que a população MS parece ter um risco cerca de 5 vezes menor para o cancro da mama do que a população MCM (OR=5,4545; IC 95%: 1,0536 - 28,2390). No gráfico nº8, está representada a distribuição por frequências para o genótipo VL para CYP1B1 versus o genótipo LL para COMT, para as duas populações em estudo.

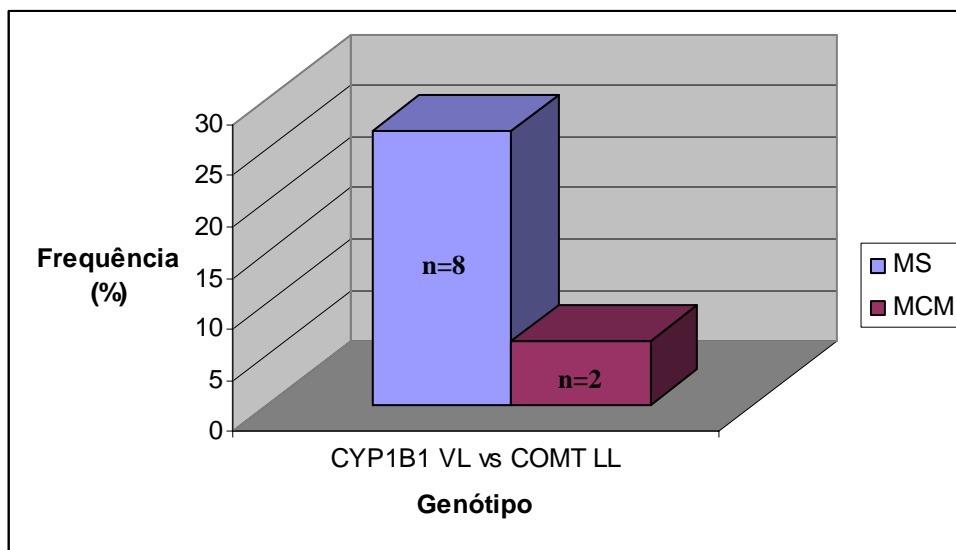


Gráfico nº8: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e LL para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama.

As enzimas CYP1B1 e COMT têm uma interação funcional bem estabelecida, ou seja, a CYP1B1 é responsável pela síntese de 4-hidroxiestradiol, enquanto, a COMT metaboliza esse produto em 4-metoxiestradiol, diminuindo assim o seu potencial carcinogénico. Por esta razão torna-se essencial avaliar o efeito combinado destas duas enzimas. Os resultados deste estudo parecem indicar que os genótipos VL para CYP1B1 e LL para COMT estão associados a um menor risco de doença, e já no ponto 4.1 tínhamos observado que as mulheres portadoras do genótipo heterozigótico para CYP1B1 Val⁴³²Leu parecem ter menor risco para o cancro da mama.

Na tabela nº 27, encontram-se os resultados do genótipo VL para CYP1B1 versus HL para COMT para a população MS e MCM. Observam-se diferenças estatisticamente significativas entre as duas populações.

Apresentação e Discussão dos Resultados

Tabela nº27: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e HL para COMT Val¹⁵⁸Met.

Genótipo	MS (n=30)	MCM (n=32)	Odds Ratio	IC 95%	P
CYP1B1 VL vs COMT HL	46,67%	21,88%	3,1250	1,0370 – 4,4175	0,0393*

* Significativo para $P < 0,05$

Na população MS, 46,67% das mulheres são portadoras do genótipo VL para CYP1B1 e HL para COMT para apenas 21,88% de mulheres na população MCM. A presença destes dois genótipos parece conferir um risco cerca de 3 vezes menor para o cancro da mama às mulheres da população MS (OR= 3,1250; IC 95 %: 1,0370 – 4,4175).

No gráfico nº9, está representada a distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 versus o genótipo HL para COMT nas duas populações estudadas.

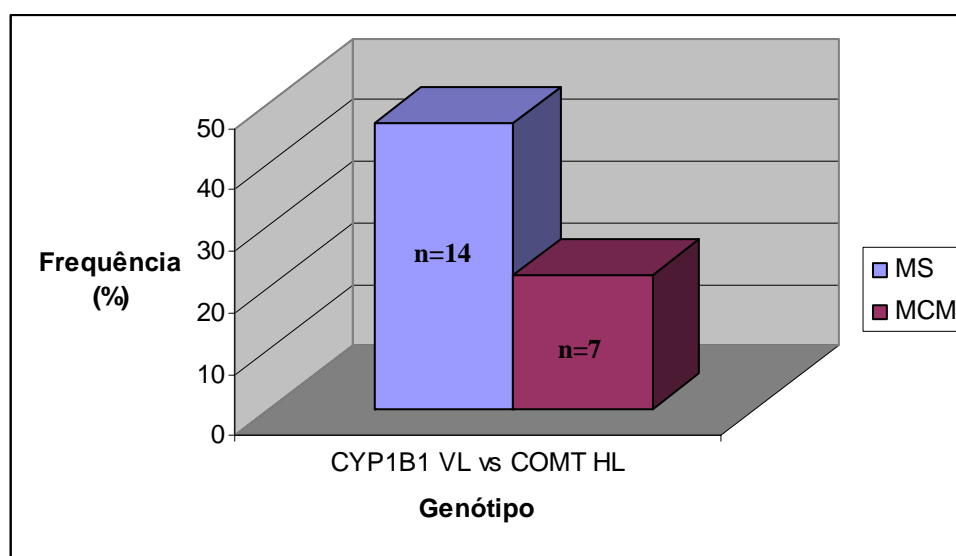


Gráfico nº9: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e HL para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama.

A ausência do genótipo heterozigótico nas mulheres da população MCM parece constituir um factor de risco. O genótipo heterozigótico, tanto para a CYP1B1 como

Apresentação e Discussão dos Resultados

para a COMT confere às enzimas uma actividade intermédia, pelo que a síntese de 4-hidroxiestradiol pela CYP1B1 e a metilação deste pela COMT provavelmente, encontra-se em equilíbrio, no que diz respeito aos efeitos dos produtos do metabolismo dos estrogénios.

Na tabela nº 28, estão os resultados do genótipo VL para CYP1B1 versus o genótipo CT para MTHFR na população saudável e população com cancro da mama. Verifica-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as duas populações e o valor de OR parece indicar que a população MS tem um risco 7 vezes menor para o cancro da mama do que a população MCM, para esta combinação de genótipos (OR= 7,0000; IC 95%: 1,9683 – 24,8951).

Tabela nº28: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e CT para MTHFR Ala²²⁵Val.

Genótipo	MS (n=30)	MCM (n=32)	Odds Ratio	IC 95%	P
CYP1B1 VL vs MTHFR CT	50,00%	12,50%	7,0000	1,9683 – 24,8951	0,0014*

* Significativo para P<0,05

Na combinação do genótipo VL para CYP1B1 em simultâneo com o genótipo CT para MTHFR observou-se que 50 % de mulheres na população MS eram portadoras destes genótipos, contra apenas 12,50% de mulheres na população MCM. Este facto parece indicar que os genótipos heterozigóticos para CYP1B1 e MTHFR estão associados a um menor risco de doença. No gráfico nº10, pode ser observado a distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 versus CT para MTHFR nas populações MS e MCM.

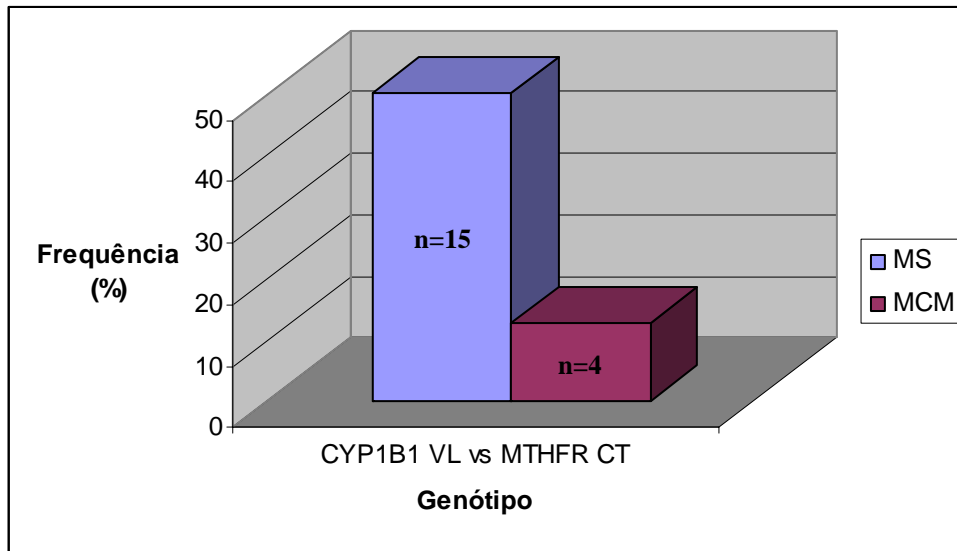


Gráfico nº10: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e CT para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama.

No nosso estudo verifica-se, no geral, que os genótipos heterozigóticos para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e para COMT Val¹⁵⁸Met estão associados a um menor risco de doença.

4.9 Distribuição por frequências para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met versus idade

Na tabela nº 29, encontram-se os resultados para a combinação dos genótipos VL para CYP1B1 versus CT para MTHFR para a população MS e MCM com idade inferior a 50 anos.

Tabela nº29: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e CT para MTHFR Ala²²⁵Val para idade inferior a 50 anos.

Genótipo	Mulheres saudáveis (n=30)	Mulheres com cancro da mama (n=32)	Odds Ratio	IC 95%	P
	<50 Anos				
CYP1B1 VL vs MTHFR CT	30,00%	3,13%	14,4000	1,5767 – 131,5166	0,0084*

* Significativo para P<0,05

No ponto 4.8 (tabela nº28), na combinação do genótipo VL para CYP1B1 simultaneamente com o genótipo CT para MTHFR observou-se que 50 % das mulheres da população MS apresentava esta combinação, contra apenas 12,50% de mulheres na população MCM. Assim, verifica-se que dos 50% de mulheres da população MS que são portadoras destes dois genótipos, 30% tem menos de 50 anos, contra apenas 3,13%, num total de 12,50%, de mulheres da população MCM. A presença desta combinação de genótipos é estatisticamente significativa para as mulheres pré-menopáusicas. Podemos então considerar, que nas mulheres em pré-menopausa, a actividade destas enzimas parece ter um papel mais importante, pois existe maior síntese e concentração de estrogénios no ambiente celular, e portanto, existe maior possibilidade para a ocorrência de toxicidade induzida pelos estrogénios e pelos seus metabolitos. No gráfico nº11, pode ser observado a distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 e CT para MTHFR, na população MS e MCM com idade inferior a 50 anos.

Apresentação e Discussão dos Resultados

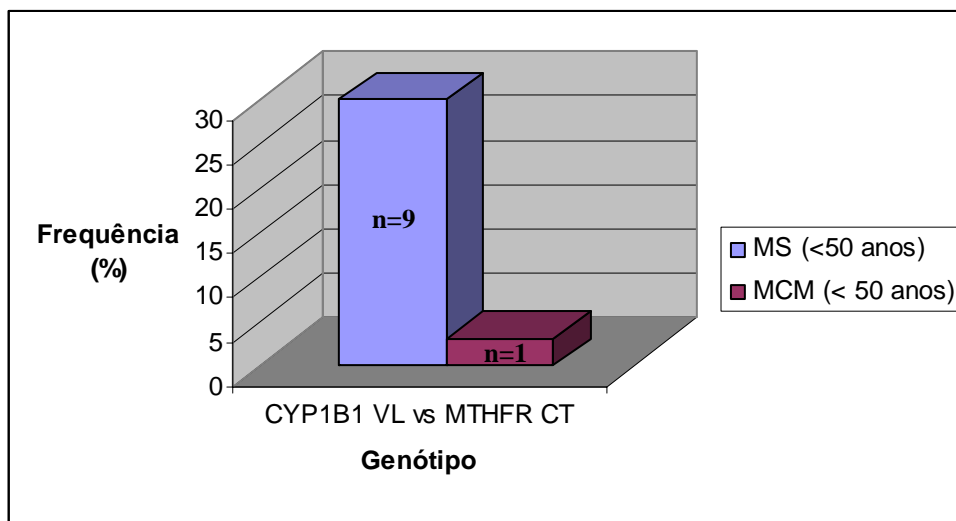


Gráfico nº11: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu e CT para MTHFR Ala²²⁵Val na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade inferior a 50 anos.

Os resultados para a combinação do genótipo CT para MTHFR com o genótipo HL para COMT para a população MS e MCM, com idade acima dos 50 anos encontram-se na tabela nº30. Estes resultados estatísticos foram obtidos pelo teste exacto de Fisher.

Tabela nº30: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos CT para MTHFR Ala²²⁵Val e HL para COMT Val¹⁵⁸Met para idade superior a 50 anos.

Genótipo	Mulheres saudáveis (n=30)	Mulheres com cancro da mama (n=32)	Odds Ratio	IC 95%	P
	>50 Anos				
MTHFR CT vs COMT HL	16,67%	3,13%	11,6667	1,1122 – 122,3807	0,0204*

* Significativo para P<0,05

Observa-se que na população MS com mais de 50 anos, 16,67% das mulheres são portadoras destes dois genótipos, para apenas 3,13% de mulheres na população MCM, gráfico nº12.

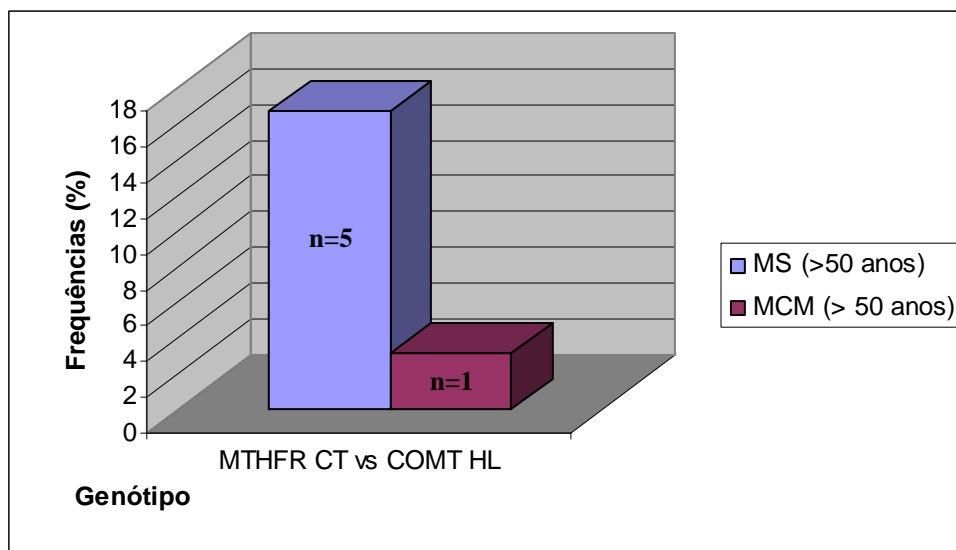


Gráfico nº12: Distribuição por frequências dos genótipos CT para MTHFR Ala²²⁵Val e HL para COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama com idade superior a 50 anos.

Uma diminuição na actividade da enzima MTHFR associada ao genótipo TT resulta numa diminuição de 5-metiltetrahydrofolato, necessário para a conversão de S-adenosilmetionina (SAM). O SAM é o dador de grupos metilos para as reacções de metilação do catecol estrogénio catalizada pela COMT.

Neste estudo, os genótipos heterozigóticos CT para MTHFR e HL para COMT parecem conferir um risco para a doença cerca de 12 vezes menor (OR=11,6667; IC 95% 1,1122-122,3807), às mulheres da população MS com mais de 50 anos, tabela nº30. Assim, verifica-se que a presença de genótipo heterozigótico para MTHFR e para COMT parece estar associada a um risco menor de cancro da mama.

4.10 Distribuição por frequências para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met, simultaneamente

Na combinação dos genótipos para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸ Met, simultaneamente, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre a população MS e a população MCM, tabela nº31.

Tabela nº31: População saudável vs População de mulheres com cancro da mama. Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu, CT para MTHFR Ala²²⁵Val e HL para COMT Val¹⁵⁸ Met.

Genótipo	MS (n=30)	MCM (n=32)	Odds Ratio	IC 95%	P
CYP1B1 VL vs MTHFR CT vs COMT HL	26,67%	3,13%	11,2727	1,3138 – 96,7224	0,0113*

* Significativo para P<0,05

Verificou-se que 26,67% das mulheres da população MS apresentava genótipo heterozigótico para todos os genes, enquanto apenas 3,13% das mulheres da população MCM eram portadoras desta combinação de genótipos, gráfico nº13.

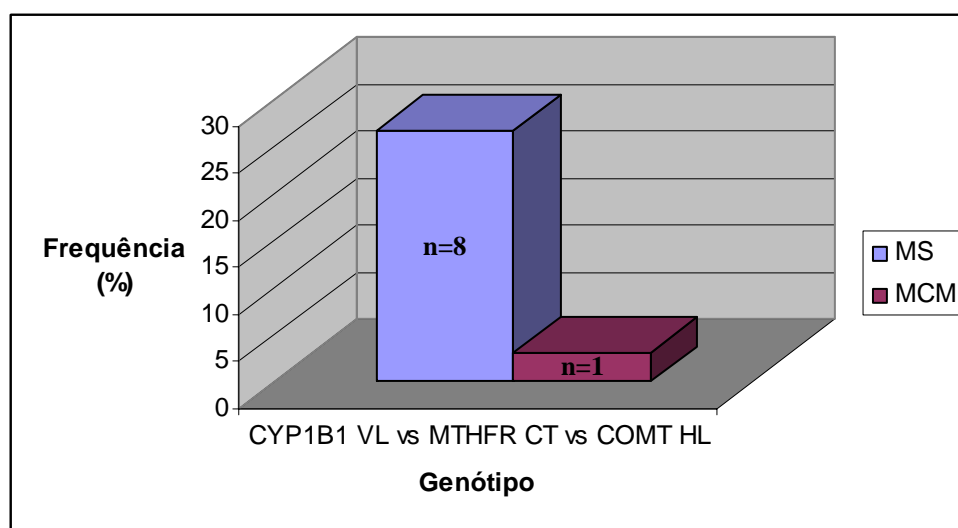


Gráfico nº13: Distribuição por frequências dos genótipos VL para CYP1B1 Val⁴³²Leu, CT para MTHFR Ala²²⁵Val e HL para COMT Val¹⁵⁸ Met na população de mulheres saudáveis vs população de mulheres com cancro da mama.

Apresentação e Discussão dos Resultados

Observa-se que as mulheres portadoras dos genótipos heterozigóticos parecem ter um risco cerca de 11 vezes menor para o cancro da mama (OR=11,2727; IC 95% 1,3138 – 96,7224). Pode-se então considerar que as mulheres com genótipos heterozigóticos parecem estar mais protegidas para a doença, que aquelas que têm genótipos homozigóticos.

Foi já referido ao longo deste capítulo que os genes da CYP1B1, da MTHFR e da COMT codificam enzimas que têm intervenção no metabolismo do estrogénios de uma forma directa ou indirecta, e que estabelecem entre elas uma ligação funcional. Mais directamente, a CYP1B1 e a COMT fazem, respectivamente, a síntese e degradação de catecol estrogénio, nomeadamente o 4-hidroxiestradiol, produto com propriedades carcinogénicas e que pode ser tóxico para as células. Indirectamente, a MTHFR converte o folato intracelular em 5-metiltetrahidrofolato, sendo este um produto necessário para a conversão de SAM, que por sua vez é necessário para as reacções de metilação da COMT.

Verificámos, que em 7 mulheres da população MCM o diagnóstico de cancro da mama foi efectuado há mais de cinco anos, pelo que estas mulheres já ultrapassaram a taxa de sobrevida de cinco anos, importante no tratamento de todas as neoplasias. Observámos que estas mulheres na sua maioria tinham genótipos heterozigóticos para a CYP1B1, MTHFR e para a COMT, o que evidencia os resultados do nosso estudo, os quais parecem indicar que as mulheres portadoras dos genótipos VL para CYP1B1, CT para MTHFR e HL para COMT têm menor risco para o cancro da mama.

4.11 Distribuição por frequências para as mutações 185delAG, 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2

As mutações no gene BRCA1 estão ligadas a 60% – 80% dos casos de cancro da mama hereditário. No caso do BRCA2, a mutação está ligada a uma menor percentagem de cancros da mama. As mutações encontradas nestes genes estão associadas a uma antecipação do risco de cancro da mama, ou seja, as mulheres portadoras de mutações nestes dois genes podem desenvolver a doença em idade mais jovem. A maioria dos casos de cancro da mama não tem origem hereditária, contudo, nas mulheres em que existe um antecedente familiar o rastreio da doença numa idade mais jovem pode ser importante.

Neste estudo, não se verificou a presença das mutações 185delAG, 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2, tanto na população de mulheres saudáveis como na população de mulheres com cancro da mama. Apenas temos um caso em que o resultado do PCR-RFLP para a mutação 5382insC no gene BRCA1 é duvidoso, aguardamos o resultado da sequenciação directa do ADN.

5 Conclusões e Perspectivas Futuras

Conclui-se que:

Este estudo demonstra que as mulheres portadoras de genótipos heterozigóticos para CYP1B1 Val⁴³²Leu, MTHFR Ala²²⁵Val e COMT Val¹⁵⁸Met parecem ter um risco menor para o cancro da mama. Esta diminuição do risco está em maior evidência nas mulheres pré-menopáusicas.

As mulheres com genótipo VV para CYP1B1 Val⁴³²Leu apresentam um risco associado ao cancro da mama aumentado. Este aumento do risco está acentuado para as mulheres abaixo dos 50 anos.

Existe um desequilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo COMT Val¹⁵⁸Met na população de mulheres da Beira Interior estudadas.

Perspectivas futuras

Dado que os polimorfismos nos genes estudados podem ser um factor de risco para o cancro da mama, em trabalhos futuros deve-se considerar o alargamento da amostra populacional para que esta represente melhor a população geral.

A inclusão de mais dados relativos à doença, como o tipo histológico, grau de metastização nos nódulos axilares e o envolvimento bilateral, bem como as características e hábitos das mulheres, como o índice de massa corporal, o uso de contracepção, entre outros, pode dar mais informação e estimar melhor o risco de doença para cada mulher.

O conhecimento dos genótipos associados a estes polimorfismos pode ajudar, nos próximos anos, a redefinir estratégias de prevenção e terapêuticas adequadas a cada indivíduo.

6 Bibliografia

Abeliovich D., Kaduri L., Lerer I., Weinberg N., Amir G., Sagi M., Zlotogora J., Heching N., Peretz T.; "The Founder Mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 Appear in 60% of Ovarian Cancer and 30% of Early-Onset Breast Cancer Patients among Ashkenazi Women"; *Am. Journal of Human Genetics*; 1997; **vol. 60**: 505-514

Arai M., Utsunomiya J., Miki Y.; "Familial Breast and Ovarian Cancers"; *Int. J. Clin. Oncology*; 2004; **vol. 9**: 270-282

Backe J., Hofferbert S., Skawran B., Dork T., Stuhmann M., Karstens J.H., Untch M., Meindl A., Burgemeister R., Chang-Claude J., Weber B.H.F.; "Frequency of BRCA1 Mutation 5382insC in German Breast Cancer Patients"; *Gynecologic Oncology*; 1999; **vol. 72**: 402-406

Bailey L.R., Roodi N., Dupont W.D., Parl F.F.; "Association of Cytochrome P450 *1B1* (CYP1B1) Polymorphism with Steroid Receptor Status in Breast Cancer"; *Cancer Research*; Novembro 1998; **vol. 58**: 5038-5041

Campbell I.G., Baxter S.W., Eccles D.M., Choong D.Y.H.; "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer"; *Breast Cancer Research*; Julho 2002; **vol. 4** (6)

Clarke L.H.; "Estrogens, BRCA1, and Breast Cancer"; *Cancer Research*; Setembro 2000; **vol. 60**: 4993-5001

Clemons M., Goss P.; "Estrogen and the Risk of Breast Cancer"; *The New England Journal of Medicine*; Janeiro 2001; **vol. 344** (4): 276-285

DeBruin L., Josephy P.D.; "Perspectives on the chemical etiology of breast cancer"; *Environmental Health Perspectives*; Fevereiro 2002; **vol. 110** (1): 119-128

Díez O., Osorio A., Durán M., Martínez-Ferrandis J.I., Hoya M., Salazra R., Vega A., Campos B., Rodríguez-Lopez R., Velasco E., Chaves J., Díaz-Rubio E., Cruz J.J., Torres M., Esteban E., Cervantes A., Alonso C., Román J.M.S., González-Sarmiento R.,

Miner C., Carracedo A., Armengod M.E., Caldés T., Benítez J., Baiget M.; “Analysis of BRCA1 and BRCA2 Genes in Spanish Breast/Ovarian Cancer Patients: A High Proportion of Mutations Unique to Spain and Evidence of Founder Effects”; *Human Mutation*; 2003; **vol. 22**: 301-312

Dufloth R.M., Carvalho S., Heinrich J.K., Shinzato J.Y., Santos C.C., Zeferino L.C., Schmitt F.; “Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history”; *Sao Paulo Medical Journal*; 2005; **vol. 123** (4): 192-197

Duncan J.A., Reeves J.R., Cooke T.G.; “BRCA1 and BRCA2 proteins: role in health and disease”; *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*; 1998; **vol. 51**: 237-247

Fodor H.F., Weston A., Bleiweiss I.J., McCurdy L.D., Walsh M.M., Tartter P.I., Brower S.T., Eng C.M.; “Frequency and Carrier Risk Associated with Common BRCA1 and BRCA2 Mutations in Ashkenazi Jewish Breast Cancer Patients”; *Am. Journal of Human Genetics*; 1998; **vol. 63**: 45-51

Folkerd E.J., Martin L.A., Kendall A., Dowsett M.; “The relationship between factors affecting endogenous oestradiol levels in postmenopausal women and breast cancer”; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 2006; **vol.102**: 250-255

Gershoni-Baruch R., Dagan E., Israeli D., Kasinetz L., Kadouri E., Friedman E.; “Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/ or ovarian cancer risk in Jewish women”; *European Journal of Cancer*; 2000; **vol. 36**: 2313-2316

Hall J.M., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B., King M.C.; “Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21”; *Science*; 1990; **vol. 250**: 1684-1689

Hanna I.H., Dawling S., Roodi N., Guengerich F.P., Parl F.F.; “Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) Pharmacogenetics: Association of Polymorphisms with Functional

Differences in Estrogen Hydroxylation Activity”; *Cancer Research*; Julho 2000; **vol. 60**: 3440-3444

Hofman W., Schlag P.M.; “*BRCA1* and *BRCA2* – breast cancer susceptibility genes”; *Journal Cancer Research of Clinical oncology*; 2000; **vol. 126**: 487-496

Huang C.S., Chern H.D., Chang K.J., Cheng C.W., Hsu S.M., Shen C.Y.; “Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility”; *Cancer Research*; Outubro 1999; **vol. 59**: 4870-4875

ICMR Bulletin; “Estrogen and Breast Cancer”; Fevereiro 2003; **vol. 33** (2)

Jakubowska A., Gronwald J., Menkiszak J., Górski B., Huzarski T., Byrski T., Edler L., Lubinski J., Scott R.J., Hamann U.; “Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism modify *BRCA1* – associated breast and ovarian cancer risks”; *Breast Cancer Research Treatment*; 2007; **vol. 104**: 299-308

Jara L., Ampuero S., Santibanez E., Seccia L., Rodríguez J., Bustamante M., Lay-Son G., Ojeda J.M., Reyes J.M., Blanco R.; “Molecular analysis of the eighteen most frequent mutations in *BRCA1* gene in 63 Chilean breast cancer families”; *Biol. Research*; Julho 2004; **vol. 37**: 469-481

Justenhoven C., Hamann U., Schubert F., Zapatka M., Pierl C.B., Rabstein S., Selinski S., Mueller T., Ickstadt K., Gilbert M., Ko Y.D., Baisch C., Pesch B., Harth V., Bolt H.M., Vollmert C., Illig T., Eils R., Dippon R., Brauch H.; “Breast Câncer: a candidate gene approach across the estrogen metabolic pathway”; *Breast Cancer Research and Treatment*; Março 2007

Kirchhoff T., Kauff N.D., Mitra N., Nafa K., Huang H., Palmer C., Gulati T., Wadsworth E., Donat S., Robson M.E., Ellis N.A., Offit K.; “*BRCA* Mutations and Risk of Prostate Cancer in Ashkenazi Jews”; *Clinical Cancer Research*; Maio 2004; **vol. 10**: 2918-2921

Kocabas N.A., Sardas S., Cholerton S., Daly A.K., Karakaya A.E.; “Cytochrome P450 *CYP1B1* and catechol *O*-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population”; *Arch. Toxicology*; 2002; **vol. 76**: 643-649

Lahad E.L., Catane R., Eisenberg S., Kaufman B., Hornreich G., Lishinsky E., Shohat M., Weber B.L., Beller U., Lahad A., Halle D.; “Founder BRCA1 and BRCA2 Mutations in Ashkenazi Jews in Israel: Frequency and Differential Penetrance in Ovarian Cancer and in Breast-Ovarian Cancer Families”; *Am. Journal of Human Genetics*; 1997; **vol. 60**: 1059-1067

Lança V., Breitenfeld L., Bicho M.P.; “Estudo dos polimorfismos do gene Catecol-O-Metiltransferase na População Portuguesa”; *Arq. Port. Ciênc. Biol*; 2001; **vol. XXVII(II)**: 143-147

Langsenlehner U., Krippel P., Renner W., Yazdani-Biuki B., Wolf G., Wascher T.C., Paulweber B., Weitzer W., Samonigg H.; “The common 677C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with breast cancer risk”; *Breast Cancer Research and Treatment*; 2003; **vol. 81**: 169-172

Langsenlehner T., Renner W., Yazdani-Biuki B., Langsenlehner U.; “Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and breast cancer risk: a nested-case-control study and a pooled meta-analysis”; *Breast Cancer Research and Treatment*; Letter to the Editor; Março 2007

Lavigne J.A., Helzlsouer K.J., Huang H.Y., Strickland P.T., Bell D.A., Selmin O., Watson M.A., Hoffman S., Comstock G.W., Yager J.D.; “An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-*O*-methyltransferase and the risk for breast cancer”; *Cancer Research*; Dezembro 1997; **vol. 57**: 5493-5497

Le Marchand L., Donlon T., Kolonel L.N., Henderson B.E., Wilkens L.R.; “Estrogen Metabolism-Related Genes and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study”; *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; Agosto 2005; **vol. 14** (8):1998-2003

Le Marchand L., Haiman C.A., Wilkens L.R., Kolonel L.N., Henderson B.E.; “MTHFR Polymorphisms, Diet, HRT, and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study”; *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; Dezembro 2004; **vol. 13** (12): 2071-2077

Liede A., Narod S.A.; “Hereditary Breast and Ovarian Cancer -in Asia: Genetic Epidemiology of BRCA1 and BRCA2”; *Human Mutation*; 2002; **vol. 20**: 413-424

Lippman M.E., Krueger K.A., Eckert S., Sashegyi A., Walls E.L., Jamal S., Cauley J.A., Cummings S.R.; “Indicators of lifetime estrogen exposure: Effect on breast cancer incidence and interaction with raloxifene therapy in the multiple outcomes of raloxifene evaluation study participants”; *Journal of Clinical Oncology*; Julho 2001; **Vol. 19** (12): 3111-3116

Lux M.P., Fasching P.A., Beckmann M.W.; “Hereditary Breast and Ovarian Cancer: review and future perspectives”; *Journal Mol. Med.*; Junho 2006; **vol. 84**: 16-28

Matsui A., Ikeda T., Enomoto K., Nakashima H., Omae K., Watanabe M., Hibi T., Kitajima M.; “Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to genotypes of catechol-*O*-methyltransferase”; *Cancer Letters*; 2000; **vol. 150**: 23-31

Modugno F., Zmuda J.M., Potter D., Cai C., Ziv E., Cummings SR, Stone KL, Morin PA, Greene D, Cauley JA; “Estrogen metabolizing polymorphisms and breast cancer risk among older white women”; *Breast Cancer Research and Treatment*; 2005; **vol. 93**: 261-270

Morrow M., Gradishar W.; “Recent Developments, Breast Cancer”; *BMJ*; Fevereiro 2002; **vol. 234**: 410-414

Mueck A.O., Seeger H.; “Breast cancer: Are oestrogens metabolites carcinogenic?”; *Maturitas, The European Menopause Journal*; 2007; **vol. 57**: 42-46

Mullineaux L.G., Castellano T.M., Shaw J., Axell L., Wood M.E., Diab S., Klein C., Sitarik M., Deffenbaugh A.M., Graw S.L.; “Identification of Germline 185delAG

BRCA1 Mutations in Non-Jewish Americans of Spanish Ancestry from the San Luis Valley, Colorado”; *Cancer*; Agosto 2003; **vol. 98** (3):597-602

Nathanson K.L., Wooster R., Weber B.L.; “Breast Cancer Genetics: What we know and what we need”; *Nature Medicine*; Maio 2001; **vol. 7** (5): 552-556

Noruzinia M., Coupier I., Pujol P., “Is BRCA1/BRCA2-Related Breast Carcinogenesis Estrogen Dependent?”; *Cancer*; Outubro 2005; **vol. 104** (8): 1567-1574

Oh D.S., Troester M.A., Usary J., Hu Z., He X., Fan C., Wu J., Carey L.A., Perou C.M.; “Estrogen-Regulated Genes Predict Survival in Hormone Receptor-Positive Breast Cancers”; *Journal of Clinical Oncology*; Abril 2006; **vol. 24** (11):1-10

Paracchini V., Raimondi S., Gram I.T., Kang D., Kocabas N.A., Kristensen V.N., Li D., Parl F.F., Rylander-Rudqvist T., Soucek P., Zheng W., Wedren S., Taioli E.; “Meta and pooled analyses of the cytochrome P-450 1B1 Val432Leu polymorphism and breast cancer: A huge-GSEC review”; *American Journal of Epidemiology*; Outubro 2006;

Peixoto A., Salgueiro N., Santos C., Varzim G., Rocha P., Soares M.J., Pereira D., Rodrigues H., Bento M.J., Fráguas A., Moura G., Regateiro F., Castedo S., Teixeira M.R.; “BRCA1 and BRCA2 germline mutational spectrum and evidence for genetic anticipation in Portuguese breast/ovarian cancer families”; *Familial Cancer*; Maio 2006; **vol. 5**: 379-387

Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., Van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Asklen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lonning P.E., Borresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. ; “Molecular portraits of human breast tumours”; *Nature*; Agosto 2000; **vol. 406**: 747-752

Pinheiro P.S., Tyczynski J.E., Bray F., Amado J., Matos E., Parkin D.M.; “Cancer incidence and mortality in Portugal”; *European Journal of Cancer*; Março 2003; **vol. 39**: 2507-2520

Pires de Matos M., Castilho M.C., Campos M.G., Ramos F., Silveira I.; “Quais os benefícios de uma alimentação rica em estrogénios?”; *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*; Jul/Set 2005; **vol. 12** (nº3): 171-182

Raicevik-Maravic L., Radulovic S.; “Breast cancer susceptibility gene 1 – BRCA1”; *Archive of Oncology*; 2000; **vol. 8** (1): 21-23

Rebbeck T.R.; “Inherited Predisposition and Breast Cancer: Modifiers of BRCA1 / 2-Associated Breast Cancer Risk”; *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 2002; **vol. 39**: 228-234

Reljic A., Simundic A.M., Topic E., Nikolac N., Justinic D., Stefanovic M.; “The Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and cancer risk: The Croatian case control-study”; *Clinical Biochemistry*; Maio 2007; doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.05.005

Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N., Bailey L.R., Dupont W.D., Parl F.F., Moore J.H.; “Multifactor-Dimensionality Reduction Reveals High-Order Interactions among Estrogen-Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer”; *Am. Journal of Human Genetics*; Maio 2001; **vol. 69**: 138-147

Rubinstein W.S.; “Hereditary breast cancer in Jews”; *Familial Cancer*; 2004; **vol. 3**: 249-257

Ruddon R.W.; “Cancer Biology”; Oxford University Press; 3ª edição; New York; 1995

Sasaki M., Tanaka Y., Kaneuchi M., Sakuragi N., Dahiya R.; “CYP1B1 gene polymorphisms have higher risk for endometrial cancer, and positive correlations with estrogen receptor α and estrogen receptor β expressions”; *Cancer Research*; Julho 2003; **vol. 63**: 3913-3918

Sazci A., Ergul E., Utkan N.Z., Canturk N.Z., Kaya G.; “Catechol-o-metyltransferase Val 108/158 Met polymorphism in premenopausal breast cancer patients”; *Toxicology*; 2004; **vol.204**: 197-202

Sharp L., Little J., Schofield A.C., Pavlidou E., Cotton S.C., Miedzybrodzka Z., Baird J.O.C., Haites N.E., Heys S.D., Grubb D.A.; “Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)”; *Cancer Letters*; 2002; **vol. 181**: 65-71

Semenza J.C., Delfino J.R., Ziogas A., Anton-Culver H.; “Breast cancer risk and mettylenetetrahydrofolate reductase polymorphism”; *Breast Cancer Research and Treatment*; 2003; **vol. 77**: 217-233

Shimada T., Watanabe J., Kawajiri K., Sutter T.R., Guengerich F.P., Gillam E.M.J., Inoue K.; “Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants”; *Carcinogenesis*; 1999; **vol. 20** (8): 1607-1613

Shrubsole M., Gao Y.T., Cai Q., Shu X.O., Dai Q., Hébert J.R., Jin F., Zheng W.; “MTHFR Polymorphisms, Dietary Folate Intake, and Braest Cancer Risk : Results from the Shanghai Breast Cancer Study”; *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; Fevereiro 2004; **vol. 13**: 190-196

Simpson P.T., Reis-Filho J.S., Gale T., Lakhani S.; “Molecular evolution of breast cancer”; *Journal of Pathology*; 20005; **vol. 205**: 248-254

Sissung T.M., Price D.K., Sparreboom A., Figg W.D.; “Pharmacogenetics and Regulation of human Cytochome P450 1B1: Implications in Hormone-mediated Tumor Metabolism and a Novel target for Therapeutic Intervention”; *Molecular Cancer Research*; Março 2006; **vol. 4** (3): 135-150

Struewing J.P., Hartge P., Wacholder S., Baker S.M., Berlin M., McAdams M., Timermman M.M., Brody L.C., Tucker M.A.; “The Risk of Cancer Associated With Specific Mutations of *BRCA1* and *BRCA2* Among Ashkenazi Jews”; *The New England Journal of Medicine*; Maio 1997; **vol. 336** (20):1401-1408

Shiri-Sverdlov R., Oefner P., Green L., Baruch R.G., Wagner T., Kruglikova A., Haitchick S., Hofstra R.M.W., Papa M.Z., Mulder I., Rizel S., Sade R.B.B., Dagan E., Abdeen Z., Goldman B., Friedman E.; “Mutatianal Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* in

Ashkenazi and Non-Ashkenazi Jewish Women With Familial Breast and Ovarian Cancer”; *Human Mutation*; Setembro 2000; **vol. 16**: 491-501

Thompson D., Easton D.; “The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes”; *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*; Julho 2004; **vol. 9** (3):221-236

Venkitaraman A.R.; “Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2”; *Cell*; Janeiro 2002; **vol. 108**: 171-182

Warner E., Foulkes W., Goodwin P., Meschino W., Blondal J., Paterson C., Ozcelik H., Goss P., Allingham-Hawkins D., Hamel N., Di Prosper L., Contiga V., Serruya C., Klein M., Moslehi R., Honeyford J., Liede .A, Glendon G., Brunet J.S., Narod S.; “Prevalence and Penetrance of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Unselected Ashkenazi Jewish Women With Breast Cancer”; *Journal of the National Cancer Institute*; Julho 1999; **vol. 91** (14): 1241-1247

Wedrén S., Rudqvist T.R., Granath F., Weiderpass E., Ingelman-Sundberg M., Persson I., Magnusson C.; “Catechol-*O*-methyltransferase gene polymorphism and post-menopausal breast cancer risk”; *Carcinogenesis*; 2003; **vol. 24** (4): 681-687

Welsh P.L., King M.C.; “BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer”; *Human Molecular Genetics*; 2001; **vol. 10** (7): 705-713

Wen W., Cai Q., Shu X.O., Cheng J.R., Parl F., Pierce L., Gao Y.T., Zheng W.; “Cytochrome *P*450 and Catechol-*O*-methyltransferase Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Chinese Women: Results from the Shanghai Breast Cancer Study and a Meta-analysis”; *Cancer epidemiology, biomarkers & Prevention*; Fevereiro 2005; **vol. 14** (2):329-335

Yager J.D., Davison N.E.; “Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer”; *The New England Journal of Medicine*; Janeiro 2006; **vol. 354**: 270-282

Yager J.D., Liehr J.G.; “Molecular Mechanisms of estrogen Carcinogenesis”; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 1996; **vol. 36**: 203-232

Yoshida K., Miki Y.; "Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage"; *Cancer Sci.*; Novembro 2004; **vol. 95** (11): 866-871

Yue W., Santen R.J., Wang J.P., Li Y., Verderame M.F., Bocchinfuso W.P, Korach K.S., Devanesan P., Todorovic R., Rogan E.G., Cavalieri E.L.; "Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potencial mechanism of estradiol induced carcinogenesis"; *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 2003; **vol. 86**: 477-486

Zheng W., Xie D.W., Jin F., Cheng J.R., Dai Q., Wen W.Q., Shu X.O., Gao Y.T.; "Genetic Polymorphism of Cytochrome P450-1B1 and Risk of Breast Cancer"; *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; Fevereiro 2000; **vol. 9**: 147-150

Zhu B.T., Conney A.H.; "Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives"; *Carcinogenesis*; 1998; **vol. 19** (1): 1-27

ANEXOS

Tabela nº32: Local de corte das enzimas de restrição usadas para digestão dos fragmentos de ADN amplificados.

Enzima de restrição	Local de corte
HinfI	5'...G ↓ A N T C...3' 3'...C T N A G ↑...5'
Eco57I	5'...C T G A A G (N) ₁₆ ↓...3' 3'...G A C T T C (N) ₁₄ ↑...5'
BbrPI	5'...C A C ↓ G T G...3' 3'...G T G ↑ C A C...5'
NlaIII	5'...C A T G ↓...3' 3'...↑ G T A C...5'
DdeI	5'...C ↓ T N A G...3' 3'...G A N T ↑ C...5'