

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO



IPOPORTO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DAS
GLUTATIONA S-TRANSFERASES, NOS GENES
GSTA1 E GSTP1, NA RESPOSTA À TERAPIA DO
CANCRO DA MAMA**

RITA RIBEIRO DA SILVA ALVES DA COSTA

Dissertação de Mestrado em Oncologia

2011

Rita Ribeiro da Silva Alves da Costa

**Influência dos polimorfismos das
Glutathione S-Transferases, nos genes GSTA1 e GSTP1,
na resposta à terapia do cancro da mama**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do
Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de
Medeiros Melo Silva
Categoria – Professor Associado Convidado com
Agregação
Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade do Porto

"The most beautiful people we have known are those who have known defeat, known suffering, known struggle, known loss, and have found their way out of the depths. These persons have an appreciation, a sensitivity, and an understanding of life that fills them with compassion, gentleness, and a deep loving concern. Beautiful people do not just happen"

Elizabeth Kübler-Ross

Às pessoas bonitas da minha vida...

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Medeiros, pelo acolhimento, oportunidade e confiança depositada no meu trabalho.

Agradeço também à Dra. Isabel Azevedo, por contribuir de uma forma tão importante neste estudo, dando o total apoio na recolha de dados clínicos dos doentes de radioterapia analisados. Espero que esta tese seja uma pequena prova de que todo o esforço valeu a pena.

Ao Grupo de Oncologia Molecular, em particular à Raquel Catarino, pela ajuda mais que preciosa, nesta recta final, na análise estatística, à Andreia Azevedo, com quem pude sempre contar, e ao Augusto Nogueira, pela partilha de conhecimentos, apoio, incentivo e disponibilidade. Um obrigada sincero.

Ao Director e Comissões responsáveis pelo Mestrado em Oncologia do ICBAS, por me proporcionarem esta oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos e por fazerem crescer o meu gosto pela investigação em oncologia.

Não posso deixar também de agradecer a todos os meus colegas de Mestrado. Pela amizade, pelos divertidos intervalos e pelos poucos, mas excelentes convívios. Um obrigada muito especial ao André e à Alice.

A todos os meus amigos que me apoiaram, me deram forças e estiveram presentes ao longo da minha Licenciatura e Mestrado. Big, Mi, Joana...obrigada pelos bons momentos de faculdade e por toda a amizade e carinho.

Pedro, meu refúgio, obrigada por tudo, mas sobretudo por me fazeres feliz.

Last but not least: à minha família, na lei e fora dela...sempre tão importantes em todas as etapas da minha vida. Su, obrigada pelas sugestões e por estares sempre pronta a ajudar-me. César, tenho imensas saudades tuas, mas sei que estamos sempre ligados. Descreveste-te uma vez como “o mais educativo familiar”... acho que por isso, por me confrontar com tantas situações presentes nas tuas “lições”, me lembro tantas vezes de ti. Pai, obrigada por acreditares em mim e saberes-me guiar, apesar de não estares sempre em cima do acontecimento. Cocas, obrigada por me ouvires e pelo teu apoio incondicional nas minhas lutas diárias.

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de siglas e abreviaturas.....	xi
1. Enquadramento Teórico	2
1.1. Cancro da Mama	3
1.1.1. Epidemiologia	4
1.1.2. Factores de risco	5
1.1.3. Etiologia e classificação patológica.....	6
1.1.4. Tratamento do Cancro da Mama	9
1.1.4.1. Cirurgia	11
1.1.4.2. Quimioterapia.....	13
1.1.4.3. Terapia dirigida	13
1.1.4.4. Hormonoterapia	13
1.1.4.5. Radioterapia.....	15
1.2. A molécula Glutathione.....	16
1.2.1. Falhas no metabolismo da Glutathione.....	17
1.2.2. Enzimas Glutathione S-Transferases	18
1.2.2.1. Polimorfismos nos genes humanos das Glutathione S-Transferases	20
1.2.2.1.1.GSTA1	23
1.2.2.1.2.GSTP1	23
2. Objectivos.....	26
2.1. Objectivo Geral.....	26
2.2. Objectivos específicos	26
3. Material e Métodos	28
3.1. Desenho experimental geral.....	28
3.2. População	28
3.3. Selecção dos doentes	29
3.3.1. Estudo da influência dos polimorfismos -567T/G, -69C/T, -52G/A e Ile105Val, nos genes GSTA1 e GSTP1, na resposta à terapia em doentes tratados com radioterapia	29

3.3.2.	Estudo da influência do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, na resposta à terapia de doentes tratados com hormonoterapia	31
3.4.	Colheita das amostra de sangue para pesquisa dos polimorfismos genéticos nos genes GSTA1 e GSTP1.....	34
3.5.	Isolamento de ADN genómico	34
3.6.	Genotipagem do polimorfismo -567T/G, -69C/T, -52G/A no gene GSTA1	34
3.7.	Genotipagem do polimorfismo <i>Ile105Val</i> no gene GSTP1	36
3.8.	Análise estatística.....	39
4.	Resultados.....	42
4.1.	Estudo da influência dos polimorfismos nos genes GSTA1 e GSTP1 na resposta à terapia em doentes tratados com radioterapia	42
4.2.	Estudo da influência do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, na resposta à terapia em doentes tratados com hormonoterapia	45
5.	Discussão.....	51
6.	Conclusão e Perspectivas futuras.....	56
7.	Bibliografia.....	57

Resumo

O carcinoma da mama é o tipo de cancro mais comum na mulher. Este atinge, a nível mundial, uma proporção de 39 novos casos por 100 mil pessoas e, em Portugal, 60 novos casos por 100 mil pessoas. A incidência desta doença tem vindo a aumentar ao longo dos anos, mas a mortalidade a diminuir. Apesar do prognóstico favorável para muitas mulheres tratadas para o cancro da mama, nalguns casos, verifica-se recidiva da doença, muito possivelmente porque as células tumorais sobrevivem ao tratamento inicial. As enzimas Glutathione S-transferases (GSTs) desempenham um papel importante na protecção celular contra o stress oxidativo e contra químicos tóxicos exteriores ao organismo. São enzimas da fase II, responsáveis pela acção catalítica de conjugação de compostos electrofílicos com a Glutathione, e estão distribuídas de forma ubíqua por todos os tecidos. O polimorfismo genético no gene GSTA1 é caracterizado por substituições *linkage* de três bases na região promotora. Estas substituições resultam em diferentes expressões proteicas: activação transcripcional mais baixa no alelo GSTA1*B (variante) do que no alelo GSTA1*A (comum). Um dos polimorfismos genéticos, no gene GSTP1, resulta numa substituição de um aminoácido, Ile105Val. A enzima que contém a Val apresenta uma actividade enzimática mais baixa, por não possuir tanta afinidade com os substratos. Doentes com cancro da mama, portadores de enzimas variantes, podem apresentar uma remoção de agentes terapêuticos, e resposta à terapia diferentes.

O objectivo principal deste trabalho consistiu na análise da possível influência dos polimorfismos -567T/G, -69C/T, -52G/A, no gene GSTA1 e Ile105Val, no gene GSTP1, das enzimas Glutathione S-transferases, no valor preditivo de resposta à terapia do cancro da mama.

Realizou-se uma avaliação das reacções agudas da pele, ao longo de sete semanas, a 100 doentes submetidos a cirurgia conservadora da mama, seguida de radioterapia. Destas 100 amostras, foram analisados, por RT-PCR, 100 casos, relativamente ao polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, e 87, por PCR-RFLP, relativamente ao polimorfismo -567T/G, -69C/T, -52G/A, no gene GSTA1. Efectuou-se também uma análise de sobrevivência global a 88 mulheres tratadas com hormonoterapia, em conjugação, ou não, com outros esquemas de tratamento, em relação ao polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1. Nenhum dos polimorfismos das GSTs conferiu um risco maior de reacções agudas da pele entre os doentes tratados com radioterapia. Contudo, verificou-se uma tendência, sem valor estatisticamente significativo ($p > 0,05$), para indivíduos portadores do alelo ¹⁰⁵Val desenvolverem mais reacções agudas da pele ao longo do tratamento comparativamente com os indivíduos portadores do genótipo ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile. Entre os doentes tratados com hormonoterapia e de

estádios mais avançados, III e IV, verificou-se que portadores do alelo ¹⁰⁵Val apresentam uma maior sobrevivência global ($p= 0,046$). Em média, estes indivíduos, vivem mais 35 meses do que os indivíduos homozigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile.

É possível que as espécies reactivas criadas durante o tratamento de radioterapia sejam menos eliminadas nos indivíduos portadores do alelo ¹⁰⁵Val, provocando um efeito tóxico visível, uma vez que atacam tanto as células tumorais como as células de tecidos normais. Por outro lado, se os indivíduos homozigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile, produzem duas proteínas normalmente activas, estes eliminam de forma mais eficiente as toxinas produzidas durante a radioterapia. A sensibilidade aos agentes anti-neoplásicos pode verificar-se pelo mau emparelhamento da proteína mutante do alelo ¹⁰⁵Val, do gene GSTP1. Ao serem menos eficazmente eliminados, devido à actividade enzimática reduzida, o tempo de semi-vida dos agentes anti-neoplásicos é maior, e portanto, o tempo de actuação é também maior, resultando numa maior eficácia e melhor resposta à terapia. Estes resultados permitem verificar que de facto pode existir um papel importante dos polimorfismos nas GSTs na determinação da resposta à terapia do cancro da mama. Serão, no entanto, necessários mais estudos para suportar as evidências observadas neste trabalho, com maior poder estatístico e representatividade da amostragem, pelo aumento do número de casos analisados e melhor estratificação das variáveis em análise.

Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer in women. Worldwide, there are 39 new cases of breast cancer per 100 000 people, and in Portugal, 60 new cases per 100 000 people. The incidence of this malignancy has increased over the years, but, on the other hand, mortality has reduced. Despite favorable prognosis, many women treated for breast cancer relapse from the disease, most likely because tumor cells survive the initial treatment. Glutathione S-transferases (GSTs) play an important role in cellular protection against oxidative stress and foreign toxic chemicals. They are phase II enzymes, responsible for catalytic conjugation of glutathione with electrophilic compounds, and are ubiquitous all tissues. Genetic polymorphism in GSTA1 gene is characterized by a linkage replacement of three bases in the promoter region. These substitutions result in different protein expression: lower transcriptional activation in the GSTA1 * B allele (variant) than verified in allele GSTA1 * A (common). A genetic polymorphism in the GSTP1 gene, results in an amino acid substitution, Ile105Val. The enzyme containing Val has a lower enzyme activity, as its affinity with substrates is also lower. Cancer patients with variant enzyme may differ in removal of treatment agents and in outcomes of therapy.

The aim of this study was to analyze the possible influence of glutathione S-transferase genetic polymorphisms -567T/G, -69C/T, -52G/A, in GSTA1 gene, and Ile105Val gene, in GSTP1 gene, as predictors of therapy response in breast cancer patients.

An assessment of acute skin reactions was carried out over seven weeks, in 100 patients who underwent breast-conserving surgery followed by radiotherapy. 100 blood samples, from these patients, were analyzed by RT-PCR, for the Ile105Val polymorphism, in GSTP1 gene, and 87 by PCR-RFLP for polymorphisms -567T/G, -69C/T, -52G/A, in GSTA1 gene. It was also analyzed overall survival in 88 women treated with hormone therapy, with or without combination of other treatment regimens, for Ile105Val polymorphism in GSTP1 gene.

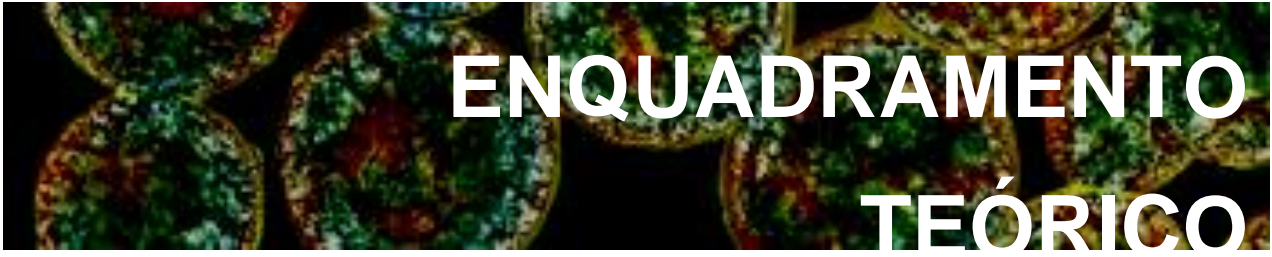
None of the polymorphisms of GSTs conferred an increased risk for acute skin reactions among patients treated with radiotherapy. However, there was a tendency, not statistically significant ($p > 0.05$), for individuals with ¹⁰⁵Val allele to develop more acute reactions during treatment than subjects with the genotype ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile. Among patients of advanced stages, III and IV, treated with hormone therapy, it was found, that carriers of ¹⁰⁵Val allele had greater overall survival ($p=0.046$). These individuals have a 35 months longer survival when compared with homozygous individuals, ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile.

It is possible that reactive species created during radiotherapy treatment are less detoxified in individuals with the ¹⁰⁵Val allele, causing a visible toxic effect, since both tumor and normal tissue cells are affected. On the other hand, individuals homozygous ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile, produce two normally active proteins which remove more efficiently toxins generated during radiotherapy. Sensitivity to anti-cancer agents can be seen by mispairing of the mutant protein encoded by the ¹⁰⁵Val allele, in GSTP1 gene. By being less effectively eliminated, due to reduced enzyme activity, the half-life of anti-cancer agents is longer, and therefore time for its action is also longer, resulting in increased efficiency and better therapy response. These results clarify that, in fact, there may be an important role of polymorphisms in GSTs in determining response to breast cancer therapy. However, additional studies are requested to support the results observed in this study, with greater statistical power and more representative samples, increasing the number of cases analyzed and making better stratification of variables to analysis.

Lista de siglas e abreviaturas

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
C	Citosina
CAT	Catalase
cGy	centiGray
Cis	Cisteína
DCIS	<i>Ductal Carcinoma in situ (Carcinoma ductal in situ)</i>
EA	Esvaziamento Axilar
G	Guanina
G6PD	Glucose-6-Fosfato
GCL	Glutamato Cisteína Ligase
Gli	Glicina
Glu	Glutamato
GPX	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GS	Glutaciona Sintetase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona dissulfeto
GST	Glutaciona S-Transferase
GSTA	Glutaciona S-Transferase alfa
GSTP	Glutaciona S-Transferase pi
Gy	Gray
HT	Hormonoterapia
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDC	<i>Invasive Ductal Carcinoma (Carcinoma ductal invasor)</i>
ILC	<i>Invasive Lobular Carcinoma (Carcinoma lobular invasor)</i>
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IVS	<i>Intervening sequence</i>
kDa	Quilo dalton

LCIS	<i>Lobular Carcinoma in situ (Carcinoma lobular in situ)</i>
Lis	Lisina
MAPEG	<i>Membrane Associated Proteins in Eicosanoid in Glutathione Metabolism</i>
Met	Metionina
mM	mili Molar
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGS	Pesquisa de Gânglio Sentinela
Pro	Prolina
QT	Quimioterapia
RE	Receptores de Estrogénio
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RP	Receptores de Progesterona
RT	Radioterapia
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
RT-PCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
Ser	Serina
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i>
SOD	Superóxido Dismutase
T	Timina
TA	Tumorectomia
Thr	Treonina
TNM	<i>Tumor-node-metastasis</i>
Val	Valina
WHO	<i>World Health Organization</i>
γGT	γ Glutamil Transferase
°C.	Graus centígrados

A horizontal banner featuring a microscopic image of plant cells, likely showing chloroplasts and cell walls, in shades of green and brown. The text "ENQUADRAMENTO TEÓRICO" is overlaid in white, bold, uppercase letters on the right side of the image.

**ENQUADRAMENTO
TEÓRICO**

1. Enquadramento Teórico

O cancro é uma doença caracterizada pela alteração de células normais que as torna capazes de um crescimento desregulado [1]. Qualquer descrição simples esconde todos os sentimentos que acompanham o desenvolvimento desta doença.

O sofrimento emocional e físico leva ao desafio da descoberta de melhorias na prevenção, no diagnóstico, no tratamento e controlo da doença. Com os métodos correctos, deveria ser possível detectá-la no seu estadio mais precoce, curá-la mais facilmente, obter um bom prognóstico de resposta à terapia e saber como é que efectivamente o paciente responde a essa mesma.

A chegada de novas e emergentes tecnologias moleculares, genéticas e imagiológicas, alargou as estratégias possíveis para a detecção precoce e prevenção do cancro, contudo, o impacto na mortalidade destas novas descobertas tem ainda de ser suportado por evidências clínicas[2].

Médicos e patologistas descrevem frequentemente o cancro como a “semente” que cresce no “solo” do corpo. Para que estas “sementes” se desenvolvam e se tornem tumores, o “solo” tem de possuir “nutrientes” para ajudar na sua proliferação. O cancro não é uma doença de uma única célula, mas uma doença que envolve dois pontos importantes: as células cancerígenas e a forma como estas colaboram ou cooperam com as células que as rodeiam .

Uma vez que o cancro é causado por mutações no ADN, este deixa uma marca que pode ser detectada através de testes sensíveis ao ADN. Contudo, estes testes requerem a execução de uma biopsia do tecido tumoral, o que representa pouca utilidade nos casos de doença assintomática. Apesar de alguns resultados promissores sugerirem a possibilidade de detectar ADN alterado em fluidos corporais para diagnóstico precoce, é mais provável que as proteínas forneçam mais informação do que o ADN, pois estas são mais diversificadas e mais intimamente ligadas com a fisiologia do tumor [3].

O genoma humano codifica vinte mil ou mais genes que, em última análise, se traduzem em centenas de milhares de proteínas diferentes. As quantidades e as formas destas moléculas conteriam informação completa de diagnóstico sobre o estado de saúde de cada indivíduo, caso fosse possível fazer uma leitura íntegra [4].

Os marcadores moleculares são identificados como formas de aumentar a capacidade de prever, detectar e monitorizar o cancro, por vezes, mesmo antes deste se desenvolver, nos primeiros sinais do seu desenvolvimento, quando a transformação carcinogénica está próxima [5].

O marcador molecular perfeito estaria inerentemente relacionado com a doença, especialmente com o processo maligno da carcinogénese ou com os mecanismos de defesa do indivíduo.

Os produtos de genes cujas mutações estão associadas a um elevado risco para cancro, ou interferem com vias de supressores tumorais, como os mecanismos da reparação de ADN e do controlo do ciclo celular, ou ajudam vias oncogénicas, pela instabilidade genética e pelo silenciamento das vias apoptóticas [6]. Encontrar marcadores moleculares associados a estes processos, e determinar onde actuam, pode conduzir a intervenções baseadas na manutenção dos processos normais e na interrupção da acção dos produtos mutacionais.

A pesquisa de marcadores moleculares para prevenção do cancro, diagnóstico precoce e vigilância de doentes já diagnosticados com a doença é um grande desafio que requer um processo de validação rigorosa, sistemática e científica. A investigação engloba um grande leque de disciplinas científicas, que incluem a bioquímica, genética, histologia, imunologia, informática e a epidemiologia. A melhor forma de definir estratégias para identificar e compreender marcadores moleculares é através de equipas multidisciplinares concentradas na mecânica da base molecular do cancro e dos processos envolvidos na carcinogénese [6].

A Epidemiologia Molecular tem um grande potencial nas várias áreas da investigação do cancro: descoberta da etiologia da doença, monitorização de risco para cancro nas pessoas expostas a carcinogénios ocupacionais e ambientais, estudo de factores que protegem contra o cancro, estudo de factores intrínsecos que predispõem para cancro e levantamento de possíveis indicadores preditivos de resposta a terapias.

Os estudos de associação genética tentam encontrar uma relação entre polimorfismos genéticos e o risco para uma doença ou resposta a tratamento. Para além disso, devido aos avanços moleculares nas tecnologias das terapias-alvo e à expansão da investigação translacional, os estudos de associação genética têm um papel crucial no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos [7].

1.1. Cancro da Mama

O cancro da mama, o mais comum nas mulheres, resulta dos efeitos combinados de factores genéticos e ambientais. Embora surjam uma série de medidas preventivas para reduzir o risco de cancro de mama, apenas algumas demonstram ser modalidades de prevenção eficientes. Entre muitas possíveis razões, existem as diferenças individuais de factores para susceptibilidade que podem complicar a eficácia da intervenção. Fortes

evidências mostram que a força de associação entre diferentes tipos de dietas, comportamentos (exercício e obesidade), exposições ambientais e o risco de cancro de mama pode ser alterado por factores genéticos individuais [8].

1.1.1. Epidemiologia

Segundo os dados da *International Agency for Research on Cancer (IARC)* de 2008, estima-se que o cancro da mama é a primeira neoplasia mais frequente na mulher, com cerca de 39 novos casos por 100 mil pessoas, no Mundo, e 60 novos casos por 100 mil pessoas, em Portugal [9]. Em Portugal, 27,7% dos cancros diagnosticados na mulher são carcinomas da mama (Figura 1.).

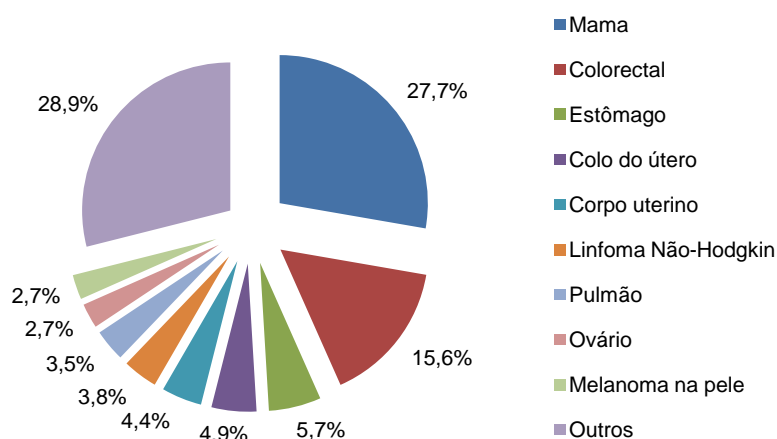


Figura 1. Incidência por cancro na mulher em Portugal (dados GLOBOCAN, 2008).

Na região do norte de Portugal, segundo o Registo Oncológico Regional do Norte, o cancro da mama é o mais frequente e representa 26,8% das neoplasias diagnosticadas no sexo feminino. A incidência nos homens é de 1,6 e nas mulheres 78,8. Cerca de 7% dos homens e 20% das mulheres atingidos pelo cancro da mama morreram no ano de 2006.

Tanto a incidência, como a mortalidade, desta doença, variam entre países e consoante a localização geográfica. Tal facto indica que alterações do estilo de vida e do ambiente podem claramente afectar a incidência do cancro da mama. O cancro da mama pode ser prevenido e as condições pré-malignas podem ser detectadas antes de existir invasão [10].

A Figura 2. representa a mortalidade por cancro no sexo feminino em Portugal. O cancro da mama é responsável por 15,9% das mortes por cancro na mulher, ficando apenas atrás das mortes causadas pelo cancro colorectal, o segundo cancro mais incidente no sexo feminino.

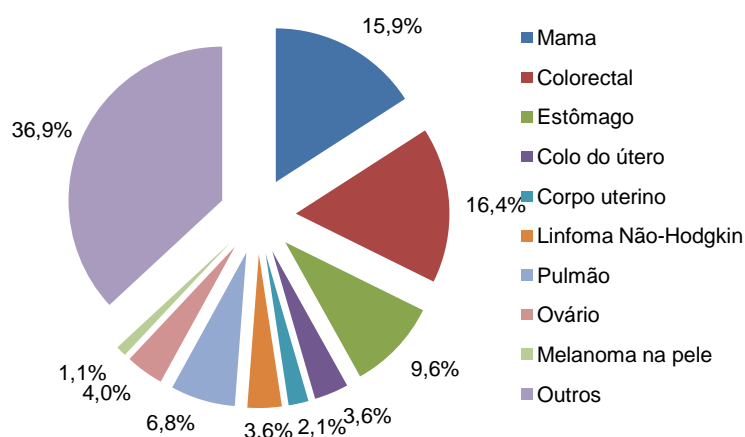


Figura 2. Mortalidade por cancro na mulher em Portugal (dados GLOBOCAN 2008).

No geral, a incidência do cancro da mama tem vindo a aumentar, mas a mortalidade a diminuir. Existem duas grandes razões para este facto: em primeiro lugar, pelo progressivo envelhecimento populacional, isto é, com o avançar da idade o risco para cancro aumenta pois ocorre uma acumulação de danos nos ácidos nucleicos que acabam por se manifestar [11]; e em segundo lugar, pela melhoria da qualidade da mamografia ao longo dos anos, que possibilita uma boa e atempada detecção da doença, visto ser o exame mais utilizado [12].

1.1.2. Factores de risco

Vários estudos epidemiológicos investigaram extensivamente factores de risco para o cancro da mama. É consensual que a exposição a estrogénios ao longo da vida da mulher é um importante factor de risco para esta doença.

Em 1983, Pike *et al.* observou que quando traçada a curva dos logaritmos da incidência e idade, relativos ao carcinoma da mama, esta não era uma linha recta como observado noutros tipos de cancro. Em vez disso, a curva assumia uma linha recta, aproximadamente até aos 50 anos, e de seguida adoptava uma inflexão com um decréscimo de valores. Esta observação importante forneceu pistas para a etiologia do cancro da mama e a dependência deste nas hormonas femininas para indução e promoção da carcinogénese. Pela curva pôde-se aferir que as mulheres pré-menopausicas possuem os componentes etiológicos necessários para o desenvolvimento do carcinoma da mama, e que o fim da ovulação diminui o efeito desses componentes [13].

A maioria dos carcinomas da mama, 75%, ocorre após os 50 anos de idade. As mulheres são 125 vezes mais susceptíveis ao cancro da mama do que os homens e tanto a incidência como a mortalidade aumentam com a idade. Factores de risco associados à exposição de estrogénios incluem idade tardia do primeiro filho e de uma gravidez (mais de 35 anos), longo período de duração entre a menarca e a menopausa, normalmente associado a idade precoce de menarca (< 12 anos) e idade avançada para menopausa (> 55 anos) [14].

A nuliparidade, a terapia hormonal de substituição por período igual ou superior a 5 anos, o consumo de álcool, o tabaco, a contracepção oral e a obesidade foram também descritos como factores de risco para o cancro da mama, embora com uma preponderância menor. Estes dois últimos factores são dependentes da idade, visto que se verificou um maior risco de cancro da mama em mulheres mais jovens do que em mulheres mais velhas [15]. A ooforectomia antes dos 35 anos tem uma acção protectora no desenvolvimento de cancro da mama [16].

Uma grande parte dos casos de cancro da mama afecta mulheres mais velhas e apresenta uma ocorrência esporádica.

Lesões proliferativas atípicas e história familiar de cancro da mama em indivíduos de 1º grau de parentesco, especialmente quando a doença tem origem multifocal ou pré-menopáusicas, são também factores de risco para o carcinoma da mama [17].

De entre os casos de cancro de mama, 10 a 15% de todos os casos e 25 a 40% dos doentes com idades inferiores a 35 anos, têm uma predisposição genética para a doença por mutações herdadas. As mutações BRCA1 (cromossoma 17q21.3) e BRCA2 (cromossoma 13q12-13) são responsáveis por 3 a 8% de todos os casos de cancro de mama e por 15 a 20% dos casos familiares. Menos comuns são as mutações nos genes *p53*, *PTEN* ou *ATM* [18].

Apesar de serem conhecidos bastantes factores de risco para o cancro da mama, numa grande parte dos casos não se consegue justificar a etiologia da doença [19].

1.1.3. Etiologia e classificação patológica

O desenvolvimento de um carcinoma num tecido ou órgão específico depende de vários factores característicos do tecido, que desempenham um papel importante na regulação de uma ou mais etapas da formação do tumor e da progressão para metastização [20].

Na mulher adulta, cada glândula mamária (Figura 3.) é, normalmente, constituída por 15 a 20 lóbulos, cobertos por tecido adiposo. É principalmente este tecido adiposo

que dá a forma característica à mama. Os lobos de cada glândula mamária formam uma massa cônica, com o mamilo situado no vértice. Cada lobo possui um único canal galactóforo ou ducto, que termina de forma independente dos outros canais à superfície do mamilo.

A pouca profundidade da superfície aureolar, o canal galactóforo dilata-se e toma a forma de fuso, para formar o seio galactóforo ou ampola galactófora, onde se acumula o leite produzido. O canal que se segue ao seio galactóforo e que drena o seu lobo, subdivide-se para formar canais mais pequenos, cada um dos quais drena um lóbulo [21].

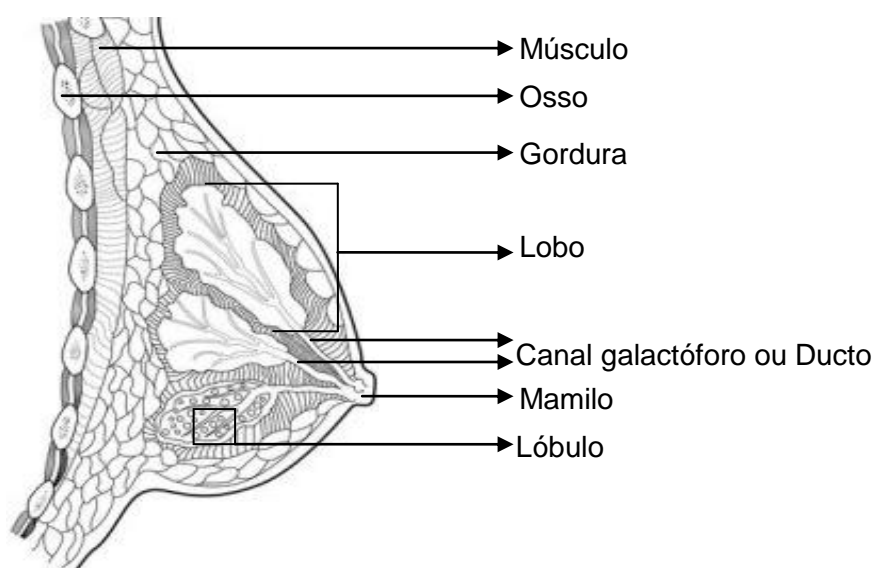


Figura 3. Anatomia da mama (imagem de PAUL WOOTTON, *Science Photo Library*©).

O cancro da mama pode desenvolver-se em várias zonas da mama: nos ductos, lóbulos ou, nalguns casos, nos tecidos adjacentes. A história natural do cancro da mama é longa, com metástases que aparecem, por vezes, décadas depois do diagnóstico inicial. O prognóstico é dependente do tamanho do tumor, envolvimento dos gânglios linfáticos, da existência de metástases aquando do diagnóstico, do grau e tipo histológico do tumor, da taxa de proliferação, da quantificação de receptores hormonais, de aneuploidias, e da sobreexpressão do $cerB_2$.

No diagnóstico do cancro da mama, os indivíduos são agrupados em estadios de acordo com a taxa de sobrevivência esperada, tendo por base a classificação de estadiamento *Tumor-node-metastasis* (TNM). A letra T corresponde à avaliação da extensão do tumor, a N ao envolvimento dos gânglios linfáticos locais e a M à detecção de metástases à distância (Tabela 1.) [22].

O estadio 0 do cancro da mama inclui carcinomas da mama não invasivos: carcinoma lobular *in situ*, carcinoma ductal *in situ*, bem como a doença de *Paget's* do mamilo quando não existe associação com doença invasiva.

O Carcinoma lobular *in situ* (LCIS) não é palpável, não evidencia alterações na mamografia e é muitas vezes descoberto acidentalmente, por biopsia que os doentes realizam por outro motivo. O comportamento biológico do LCIS ainda está por entender.

Tabela 1. Estadiamento do cancro da mama (adaptado de Singletary *et al.* e de Jardines *et al.* [18,23]).

Estadio	Sub-classe	T	N	M	Taxa de sobrevivência aos 8 anos (%)
0	0	T _{is}	N0	M0	-
I	I	T1/T _{mic}	N0	M0	90
		T0	N1	M0	
II	IIA	T1/T _{mic}	N1	M0	70
		T2	N0	M0	
	IIB	T2	N1	M0	
		T3	N0	M0	
III	IIIA	T0	N2	M0	40
		T1/T _{mic}	N2	M0	
		T2	N2	M0	
	IIIB	T3	N1	M0	
		T3	N2	M0	
		T4	N0	M0	
IIIC	T4	N1	M0		
	T4	N2	M0		
IV	IV	Qualquer T	N3	M0	
IV	IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	10

T-extensão do tumor primário; is- *in situ*; N- metástase no gânglio linfático regional; M-metástase à distância; mic-microinvasor.

Muitos clínicos concordam, no entanto, que é um factor de risco para vir a desenvolver todos os tipos de cancro, tanto invasivo como não invasivo. Aproximadamente 20% a 25% das mulheres com LCIS vão desenvolver um cancro invasivo dentro de 15 anos após o diagnóstico.

Verifica-se, cada vez mais, que o carcinoma invasivo tem origem nos ductos e que ambos os lados da mama estão em risco. Até à data, não há nenhum marcador molecular fidedigno que determine se doentes com LCIS vão desenvolver mais tarde um carcinoma da mama invasivo.

O Carcinoma Ductal *in situ* (DCIS) é o tipo mais comum dos cancros de mama não invasivos. Ductal significa que o cancro tem início nos canais galactóforos, carcinoma refere-se a qualquer neoplasia maligna com origem em células epiteliais e *in situ* indica

que o tumor está no local onde teve origem [24]. O DCIS é classificado como não invasivo pois não se alastra para além dos canais galactóforos, para o restante tecido da mama. O DCIS não coloca a vida de um indivíduo em risco, mas pode aumentar o risco de vir a desenvolver um cancro de mama invasivo numa fase posterior.

O estadio I do carcinoma da mama engloba desde os tumores microinvasivos ($\leq 0,1\text{cm}$) a tumores com tamanhos iguais ou superiores a 2 cm sem evidência de metastização para os nódulos linfáticos regionais.

O Carcinoma Ductal Invasor (IDC), por vezes também designado de carcinoma ductal infiltrativo, é o tipo mais comum de cancro da mama, representando cerca de 80% dos cancros da mama. Em pouco tempo, o IDC pode invadir todo o tecido da mama, alastrar-se até aos nódulos linfáticos e, possivelmente, a outras zonas do organismo.

Apesar do IDC poder atingir as mulheres em qualquer idade, é mais comum à medida que a idade aumenta. O IDC também pode afectar os homens.

Por outro lado, apenas 5%-10% dos carcinomas invasivos da mama têm origem lobular, os carcinomas lobulares invasivos (ILC) [25].

O estadio II do cancro da mama engloba os tumores primários de tamanho superior a 2 cm, que atingem os gânglios linfáticos axilares perto destes, e os tumores de tamanho superior a 5 cm, sem envolvimento de nódulos linfáticos. Este tipo de doentes, de estadio II, é um grupo mais heterogéneo do que a população de estadio 0 e I [26].

Os estadios III e IV são atribuídos aos doentes que apresentam carcinomas da mama localmente avançados, localmente recorrentes e metastáticos. Cerca de 20% a 25% dos casos de cancro da mama pertencem a estes estadios [27].

1.1.4. Tratamento do Cancro da Mama

O tratamento de cancro da mama tem várias abordagens possíveis, mas a decisão do esquema mais benéfico para cada paciente é feita com base no estadiamento (Figura 4.).

Uma vez diagnosticado o cancro da mama, o tumor pode ser classificado como invasivo ou não invasivo. O tratamento típico para doentes com tumores não invasivos é a excisão cirúrgica seguida ou não de radioterapia para eliminação de vestígios de doença loco-regionais. No caso de o tumor apresentar características invasivas, existem duas abordagens possíveis. Na primeira, em casos de tumores mais avançados, pode-se recorrer a terapia neoadjuvante (antes da cirurgia) que tem como benefícios a redução do tamanho do tumor e a exérese deste por cirurgia conservadora da mama, evitando a mastectomia [28]. Na segunda, procede-se à cirurgia da mama e dos nódulos linfáticos

axilares. A biopsia dos nódulos linfáticos é indicada para determinar a existência de linfoma ou carcinoma metastático [29].

Assim, um nódulo negativo significa que o tumor não metastizou contudo, o tratamento de tumores invasivos surge mais agressivo do que no caso do tratamento de tumores não invasivos.

Após o resultado da biopsia aos nódulos linfáticos, pode-se proceder ao tratamento com quimioterapia ou radioterapia, conjugadas ou não com hormonoterapia.

Numa grande maioria destes doentes, o tratamento é eficaz, contudo, uma porção desenvolverá, especialmente nos primeiros anos após o tratamento, recorrência local e acabará por morrer de cancro de mama. A selecção da terapia ideal para minimizar recidivas é um desafio actual [30].

O tratamento rotineiro de DCIS inclui cirurgia conservadora da mama seguida de radioterapia, mastectomia, apenas cirurgia conservadora da mama ou hormonoterapia.

Contudo, cada caso é encarado de forma diferente. Se o DCIS é, por exemplo, de grandes dimensões e de alto grau é provável que este tenha características mais agressivas e por isso o tratamento deve ser mais extensivo. O mesmo se aplica para doentes com idade inferior a 40 anos, uma vez que o risco de recorrência é maior em pessoas mais jovens.

Doentes que realizam cirurgia conservadora da mama para DCIS, sem depois efectuarem radioterapia, têm uma probabilidade entre 25 a 30% de sofrerem uma recidiva mais tarde. Incluir a radioterapia no plano de tratamento após a cirurgia, baixa o risco de recidiva em cerca de 15%. Se a recidiva ocorrer, esta é não invasiva em metade dos casos e invasiva na outra metade.

O tratamento para carcinoma ductal invasivo abrange duas categorias: tratamento local, que inclui cirurgia e radioterapia, e tratamento sistémico que inclui quimioterapia, hormonoterapia e terapia dirigida.

Dada a grande diversidade de terapias existentes, surge uma grande necessidade para definir que tratamentos são mais adequados para cada caso específico dos doentes.

A Figura 4. exemplifica que abordagens terapêuticas se podem fazer em cada doente. Contudo, ainda não é possível definir com confiança, que os doentes irão beneficiar de um determinado tratamento ou de outro. É fundamental que se façam estudos de resposta à terapia, para delinear tratamentos individualizados com a máxima eficácia e respostas completas no combate ao cancro.

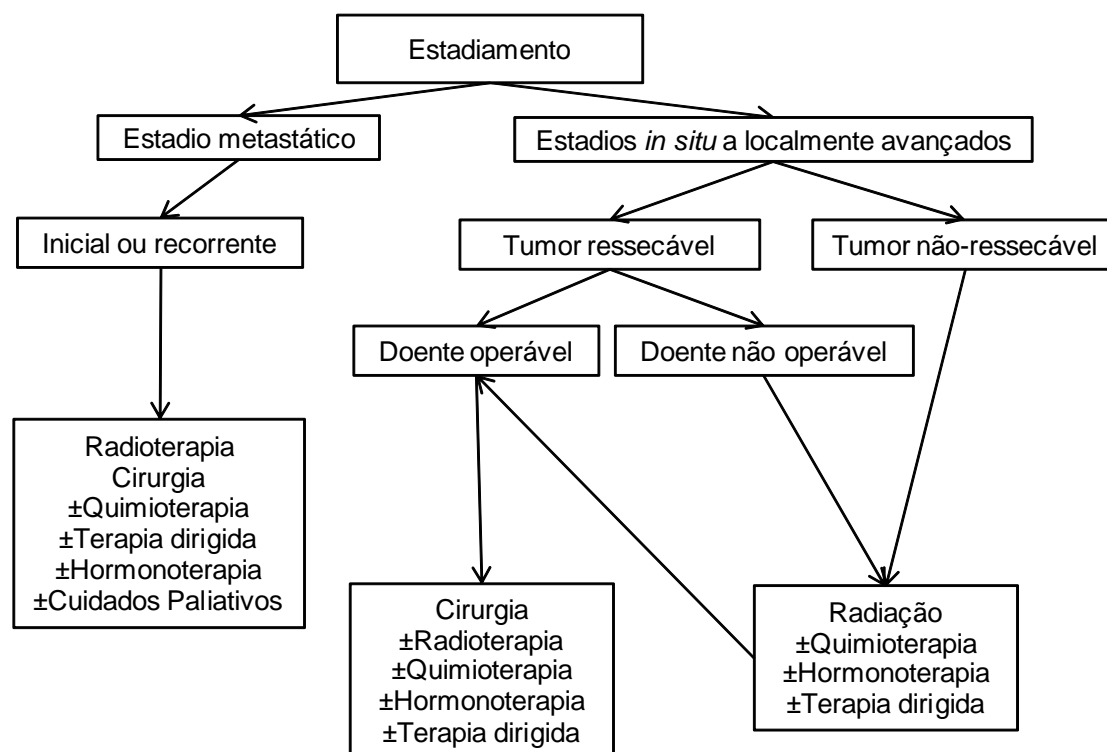


Figura 4. Esquema que sumariza as possíveis abordagens do tratamento do cancro da mama consoante o estadiamento do doente (adaptado de Maughan *et al.* 2010 [31]).

Em 1979, a *World Health Organization* (WHO) definiu quatro tipos de resposta ao tratamento anti-neoplásico: resposta completa, remissão parcial, progressão e doença estável. Na resposta completa, verifica-se o desaparecimento de todos os sinais clínicos, radiológicos e biológicos do tumor. A redução do produto de dois diâmetros tumorais em, pelos menos, 50% corresponde a uma remissão parcial do tumor. Observa-se progressão quando se dá um aumento do produto de dois diâmetros tumorais em, pelo menos, 25%. Por fim, a doença é considerada estável quando se dá ou uma redução menor do que 50%, ou um aumento menor do que 25%, no produto de dois diâmetros tumorais em, pelo menos, 25% [32].

1.1.4.1. Cirurgia

No final do século XIX, o cancro da mama era considerada uma doença fatal. Em 1880, W.S. Halsted descreveu a mastectomia radical como forma de tratar os doentes com cancro da mama e a perspectiva inicial da doença alterou-se [33]. Este tratamento cirúrgico agressivo em que a mama, os gânglios linfáticos axilares e os músculos do peito são todos removidos, permaneceu como o tratamento *standard* até meados do século XX. Até aos inícios dos anos 70, quase metade (48%) dos doentes com cancro da mama

eram tratados com mastectomia radical [34]. Hoje, apenas se aplica esta cirurgia a alguns casos de doença localmente avançada.

Algum tipo de terapia cirúrgica é indicado em quase todas as mulheres com cancro da mama, geralmente, como primeira fase de um plano de tratamento composto por várias componentes. O objectivo principal da cirurgia, nos dias de hoje, é a remoção do tumor e a definição correcta e rigorosa do estadio da doença [35].

A tumorectomia é uma cirurgia onde se remove o tumor e uma pequena quantidade de tecido normal que rodeia o tumor. Existe um enorme debate à volta da margem óptima ou da quantidade de tecido normal adjacente ao tumor necessário remover. Embora seja acordado que o objectivo da cirurgia conservadora da mama é reduzir ao máximo a massa tumoral e obter margens livres de doença, uma margem sem tumor não garante uma ausência completa de doença. Contudo, margens livres são a segurança de que o tumor é reduzido ao nível microscópico, que pode ser controlado por radioterapia.

A existência de margens positivas na análise da peça, depois de realizada a cirurgia inicial conservadora da mama, requer, geralmente, que o paciente volte ao bloco operatório para proceder à dissecação e total remoção do tumor.

A tumorectomia alargada consiste na excisão alargada de tecido normal adjacente ao tumor.

O gânglio linfático sentinela é o primeiro nódulo na drenagem linfática do tumor. A pesquisa de gânglio sentinela pode ser feita com a injeção de um corante específico, que irá ser drenado até ao gânglio sentinela, ou por injeção de compostos radioactivos que irão ser mapeados com uma câmara, ou com sondas de detecção intra-operatória especialmente desenhadas para essa finalidade. Assim, o cirurgião procede à remoção dos gânglios que fixaram o produto radioactivo e/ou o corante pois poderão ser os mesmos gânglios que fixariam as células tumorais caso estas tenham entrado na corrente linfática. A vantagem da utilização desta técnica é o facto de se evitar uma dissecação axilar desnecessária.

Alguns doentes tratados com cirurgia conservadora da mama podem fazer a remoção de alguns gânglios linfáticos debaixo do braço para biopsia. A esta intervenção dá-se o nome de esvaziamento axilar que tanto pode ser feito em simultâneo com a tumorectomia, como depois. No esvaziamento axilar é realizada uma incisão diferente.

A cirurgia da mama é uma cirurgia bastante segura, mas como qualquer intervenção, tem as suas complicações. As possíveis complicações verificadas incluem: hemorragia, infecção (celulite e abcesso), seroma, morbidez do braço (inclui linfedema), síndrome da mama fantasma (*Phantom breast syndrome*) e lesão dos nervos motores [35].

1.1.4.2. Quimioterapia

Normalmente, a acção da quimioterapia verifica-se pela morte de células que se dividem rapidamente como é o caso da maioria das células cancerígenas.[36].

A quimioterapia não é habitualmente aplicada em casos onde o tumor não é invasivo, como é o caso do DCIS, uma vez que não há necessidade de atacar células que possam ter migrado e invadido outros órgãos e tecidos localizados noutras áreas do organismo.

Existem muitos esquemas de tratamento para a quimioterapia, cujos agentes mais utilizados no tratamento do cancro da mama incluem as antraciclina e os taxanos.

Outros agentes como a gemcitabina, a capecitabina, a vinorelbina e platinos, são muitas vezes utilizados, isoladamente ou em combinação com outras drogas, para além de terapias de primeira linha, em carcinomas metastáticos. Os efeitos farmacogenómicos destas drogas podem ser confundidos com a combinação destas e outros regimes de tratamento e/ou com tratamentos efectuados anteriormente, o que resulta em tumores resistentes à terapia e toxicidades associadas elevadas [37].

1.1.4.3. Terapia dirigida

As terapias dirigidas, ou terapias alvo, são desenhadas para interagirem com vias moleculares específicas das células e alcançarem um efeito anti-tumoral [38].

O anti-cerB₂ e os agentes anti-angiogénicos, são tratamentos aprovados para carcinomas avançados da mama.

São esperados estudos, na área da farmacogenómica, que permitam uma melhor selecção dos doentes a beneficiar destes tratamentos, para justificar o custo, uma vez que o dinheiro gasto é muitas vezes proibitivo de realizar este tipo de terapias já que também não há certezas de que o efeito destas vá ser positivo [37].

1.1.4.4. Hormonoterapia

Biologicamente, os estrogénios e outras hormonas esteróides aumentam a proliferação e pensa-se que provocam danos no ADN, através de processos oxidativos [39,40], exercendo um efeito promotor sobre tumores mamários [41].

A hormonoterapia bloqueia ou reduz a quantidade de hormonas presentes no corpo. Esta diminui substancialmente o risco de recorrência local após cirurgia conservadora da mama, nos doentes que têm tumores positivos para receptores

hormonais. Contudo, existe ainda pouca informação relativamente à melhor abordagem terapêutica, que permita maximizar o seu efeito positivo e diminuir os efeitos tóxicos [42].

O tamoxifeno é utilizado no tratamento de tumores de mama de estadios precoces e avançados, carcinomas ductais *in situ*, e como tratamento primário em mulheres de alto risco, com receptores positivos de estrogénios. O modulador selectivo de receptores de estrogénio, tamoxifeno foi a escolha *standard* de terapia adjuvante endócrina para redução de recidiva do cancro da mama desde 1970. Cinco anos de tratamento com tamoxifeno demonstraram uma redução significativa tanto de recidiva de doença, como de mortalidade específica do cancro da mama. Por tal facto, o tamoxifeno era recentemente utilizado em doentes com cancro da mama, receptores hormonais positivos. Contudo, existem limitações no uso do tamoxifeno que incluem efeitos secundários potencialmente graves, como o elevado risco de tromboembolismo, trombose, e cancro no endométrio, que afecta uma pequena quantidade de doentes [43].

A enzima aromatase é responsável pela conversão de androgénios em estrogénios distribuídos pelo corpo. A regulação e inibição da sua actividade atraíram um interesse considerável na investigação, devido ao importante papel na regulação da síntese de estrogénios em mulheres pós-menopausicas, uma vez que os estrogénios são responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento de tumores da mama dependentes de hormonas.[44]

Para além do tamoxifeno, os inibidores de aromatase (IAs) têm sido muito utilizados na terapia do cancro da mama. A terceira geração de inibidores de aromatase, foi introduzida no final dos anos 90, e alargou as opções de tratamento adjuvante endócrino para mulheres pós-menopausicas com cancro de mama e receptores hormonais positivos.

Ainda não foram descritas associações farmacogenéticas que indiquem a eficácia ou toxicidade da utilização dos IAs, contudo grandes esforços têm sido feitos nesse sentido para elucidar os mecanismos aliados. O alvo dos IAs, é o citocromo P450, codificado pelo gene CYP19A1 ou pelo gene da aromatase [37].

Os inibidores de aromatase correntemente disponíveis incluem o anastrozole, o letrozole e o exemestano [30].

O letrozole é o inibidor de aromatase mais potente, é metabolizado pelas enzimas CYP1A2 e CYP2C9, e a sua utilização tem demonstrado ser, nalguns casos, mais eficaz quando comparado com o tamoxifeno [45].

O exemestano é um inibidor de aromatase esteróide que possui um modo de acção muito específico que reduz drasticamente os níveis de estrogénio ao redor e no interior do tumor [46].

1.1.4.5. Radioterapia

A radioterapia destrói qualquer tipo célula, e a irradiação de tecidos normais pode causar efeitos adversos. Definir com a máxima precisão o foco de irradiação é o que mais protege as células normais, principalmente as células do coração e dos pulmões, no caso do tratamento do cancro da mama [47].

As células que têm uma oxigenação adequada são mais susceptíveis aos efeitos da radiação. Às células próximas do centro de um tumor muito grande chega, por vezes, pouco sangue e, portanto, pouca quantidade de oxigénio, o que dificulta o efeito da radiação nas células a eliminar. À medida que o tumor se torna mais pequeno, as células sobreviventes são mais irrigadas, o que as torna mais vulneráveis à dose seguinte de radiação. Assim, distribuindo a radiação em doses repetidas durante um período prolongado, aumenta o efeito letal sobre as células do tumor e diminui o efeito tóxico sobre as células normais. O plano de tratamento aponta para a máxima reparação das células e tecidos normais, já que as células têm a capacidade de recuperar por si mesmas depois de terem sido expostas à radiação.

A definição adequada dos protocolos da radioterapia e da dose a administrar, após cirurgia conservadora da mama, requer um planeamento pormenorizado. Para alcançar um óptimo resultado cosmético, é necessário que haja uma distribuição da radiação homogénea por toda a mama. Doses entre os 180-200 cGy por dia à mama intacta até um total de 4500-5000 cGy, são consideradas *standard*. Muitas vezes é ainda administrada uma dose adicional de radiação de 10 Gy (*Boost*). Ensaio clínicos randomizados demonstraram uma pequena, mas estatisticamente significativa, redução de recidiva em tumores da mama ipsilaterais (que se manifestam no mesmo local) com o uso de dose adicional de 50 Gy em toda a mama [48].

A deposição de energia nos tecidos provoca danos no ADN e diminui, ou acaba com a capacidade das células de se replicarem [49]. Os efeitos citotóxicos da radioterapia devem-se, também, à acrescida formação de radicais hidroxil e espécies reactivas de oxigénio. Estes compostos têm capacidade de causar dano nas células [50].

A formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) é característica da hipoxia e, particularmente, da re-oxigenação. Os principais componentes celulares afectados pelas espécies reactivas de oxigénio incluem lípidos (peroxidação de ácidos gordos insaturados das membranas) e proteínas [51].

O grau de efeitos adversos varia consoante a dose total, o volume sujeito a radiação, os órgãos em risco e o intervalo entre sessões de tratamento [47,52]. Reacções agudas que aparecem durante ou pouco tempo depois do tratamento, são

frequentemente passageiras [53]. Contudo, os efeitos a longo prazo verificados vários meses ou até anos depois do tratamento de radioterapia estar completo, podem progredir ao longo de toda a vida do doente, e são tipicamente irreversíveis [54].

Os critérios de morbidez aguda do *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) são utilizados para a classificação ou para definir a toxicidade da resposta à radioterapia. A tabela 2. mostra pormenorizadamente os vários critérios desta escala, relativamente a reacções da pele.

Tabela 2. Tabela de critérios de morbidez aguda da pele do RTOG.

Grau	Crítérios
0.	Sem alterações
1.	Eritema ligeiro. Descamação seca. Hiposudorese.
2.	Eritema moderado ou acentuado. Descamação húmida heterogénea ou edema moderado.
3.	Descamação húmida confluyente (em outras áreas além de pregas cutâneas. Edema acentuado.
4.	Ulceração. Hemorragia. Necrose.

Todos os critérios, não apenas os da pele, são relevantes para o acompanhamento do tratamento desde o primeiro dia, início do tratamento, até 90 dias depois.

1.2. A molécula Glutathiona

A glutathiona (GSH) é um derivado de aminoácidos muito peculiar com várias funções importantes na defesa antioxidante, no metabolismo e na regulação de eventos celulares dos animais [55].

Pode actuar directamente como um co-factor em reacções enzimáticas, ou indirectamente como principal tampão redutor tiol-dissulfito das células mamíferas.

A GSH é um tripeptídeo que contém um grupo sulfrídilo, e é produzido naturalmente pelo organismo, sendo essencial para a sobrevivência das células eucarióticas [56,57]. É o principal antioxidante intracelular, crucial na manutenção homeostática do estado de oxidação-redução das células. A glutathiona, e o metabolismo associado, promovem a primeira linha de defesa das células, na protecção contra o stress oxidativo e outras formas de stress [58]. A GSH tem um papel chave na desintoxicação pois reage com subprodutos resultantes do metabolismo aeróbio.

A GSH é sintetizado a partir de glutamato (Glu), cisteína (Cis) e de glicina (Gli) pela acção sequencial da glutamato cisteína ligase (GCL) e da glutathione sintetase (GS). A GSH é utilizada para eliminar espécies reactivas de oxigénio como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) numa reacção catalizada pela glutathione peroxidase (GPX). O H_2O_2 é produzido a partir do peróxido (O_2^-) pela enzima superóxido dismutase (SOD) e pode ser também removido das células pela catalase (CAT), excepto o peróxido de hidrogénio produzido pelas mitocôndrias. O produto da oxidação da glutathione pela acção da glutathione peroxidase é a glutathione dissulfeto (GSSG). A GSSG pode ser convertida novamente na forma tiol reduzida, GSH, pela acção da glutathione reductase (GR). Esta requer NADPH para actuar, que adquire pela actividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a primeira enzima da via das pentoses fosfato. A GSH pode ser também utilizada na desintoxicação de produtos electrófilos endógenos e exógenos pela conjugação via glutathione S-transferase (GST). Estes conjugados, bem como a GSH, podem ser transportados para fora da célula, onde pela acção da γ -glutamyl transferase (γ -GT) geram aminoácidos γ -glutamyl e Cis-Gli [59].

Em condições normais, grande parte da GSH existe na forma reduzida (0,5 a 10mM). A oxidação da forma reduzida ocorre ou por interacção directa com radicais livres ou, mais frequentemente, quando a glutathione actua como cofactor de enzimas antioxidantes.

As células são sensíveis a sinais de mudança no seu ambiente. Um grande número de processos celulares é afectado pelo estado redox da célula, onde a GSH tem um papel essencial, com muitas moléculas sinalizadoras a serem activadas pelo estado redox da GSH. Estas moléculas, por sua vez, estão envolvidas em várias vias celulares como proliferação, diferenciação e morfogénese.

Um importante número de proteínas nucleares, incluindo factores transcripcionais, necessita de um estado reduzido para se ligar ao ADN.

1.2.1. Falhas no metabolismo da Glutathione

Défices nos níveis de glutathione contribuem para um elevado stress oxidativo, que desempenha um importante papel no envelhecimento e na patogénese de várias doenças: kwashiorkor, Alzheimer, Parkinson, doenças de fígado, fibrose cística, SIDA, diabetes, trombose e cancro [55]. São necessários novos conhecimentos da regulação do metabolismo da GSH para o desenvolvimento de estratégias que melhorem a saúde das pessoas e o tratamento dessas doenças.

Células com índices altos de proliferação têm níveis elevados de glutathiona. Esta característica é geralmente vista como um mecanismo de defesa contra a radiação ionizante e a quimioterapia.

O metabolismo da GSH tem um papel complexo no cancro e na terapia anti-neoplásica. Embora seja importante na desintoxicação de carcinogénios, quantidades elevadas de GSH podem aumentar a resistência, em vários tipos de tumor, à quimio e radioterapia [57].

Por outro lado, vários estudos demonstraram que a administração de GSH *in vivo* pode activar células T citotóxicas e a carência de GSH intracelular pode inibir a activação de linfócitos, o que inibe a sua função citotóxica [60].

Um estudo de 2004, revelou que a GSH desempenha um papel importante na actividade da telomerase. Esta enzima, necessária para o alongamento dos telómeros, está sobreexpressa em células germinativas e neoplásicas [61]. A actividade elevada da telomerase é um marcador de malignidade e de mau prognóstico [62]. Cerca de 90% de todas as neoplasias humanas estudadas, apresentam altos níveis de expressão da telomerase [63]. No cancro da mama, por exemplo, existe uma relação comprovada entre a actividade da telomerase e o estadiamento TNM [64,65]. O estudo evidencia, assim, através de experiências *in vitro*, uma correlação entre a actividade da telomerase e os níveis máximos da GSH, verificados durante a proliferação celular, presentes nas células. Verificou-se que um ambiente reduzido nas células normais, aumenta a actividade da telomerase para valores tão elevados como os das células cancerígenas [62].

A importância fisiológica da GSH é realçada pela abundância e grande distribuição deste composto por diferentes tipos de células[57].

1.2.2. Enzimas Glutathiona S-Transferases

Para além de nutrientes necessários, os humanos ingerem diariamente uma grande variedade de químicos desnecessários que têm de ser removidos do organismo. Estes xenobióticos incluem uma vasta variedade de metabolitos derivados de plantas, onde nem todos são inócuos, e uma grande diversidade de produtos sintéticos: drogas, intoxicantes, aditivos alimentares, químicos industriais e utilizados na agricultura, e produtos presentes no fumo do tabaco e em alimentos fritos, assados ou fumados.

Os produtos solúveis em água podem ser excretados pela urina ou pela bÍlis, mas os xenobióticos lipofÍlicos não são facilmente eliminados do organismo. Estes tendem a acumular no tecido adiposo e noutras estruturas ricas em lípidos. Para que os xenobióticos lipofÍlicos possam ser removidos, têm primeiro de ser metabolizados para

dar origem a produtos solúveis em água. Os órgãos mais importantes no metabolismo de xenobióticos são o fígado, o intestino e os pulmões.

Os xenobióticos são assim metabolizados em duas fases. Nas reacções da fase I, as substâncias são oxidadas, normalmente pela ligação de um ou mais grupos hidroxil. Por vezes, estas reacções desintoxicam uma substância tóxica ou põem fim à acção de uma determinada droga. Contudo, verifica-se que nalguns casos, substâncias inicialmente inofensivas são convertidas em toxinas ou em pró-drogas inactivas processadas farmacologicamente em metabolitos activos.[66]

As glutathione S-transferases (GSTs), também designadas apenas por glutathione transferases, são enzimas que pertencem ao sistema de desintoxicação celular da fase II. Este tipo de enzimas é responsável por reacções de biotransformação, também denominadas por reacções de conjugação. As enzimas da fase II desempenham um papel importante na biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos em formas mais facilmente eliminadas, bem como na inactivação metabólica de substâncias biologicamente activas [67].

A principal função biológica das GSTs é, no entanto, a defesa contra compostos electrófilos reactivos e tóxicos formados em processos metabólicos. Muitos destes compostos surgem pela acção do citocromo P450 e outras oxidases em reacções celulares oxidativas [68]. Assim, as GSTs neutralizam carcinogénios através de reacções de conjugação de metabolitos tóxicos, tanto endógenos como exógenos, com glutathione, transformando-os em produtos hidrófilos mais facilmente eliminados do organismo [69]. Os conjugados de GSH são transportados pelas membranas celulares e excretadas, em última instância, na urina e nas fezes [59].

As GSTs estão distribuídas de forma ubíqua por todo o organismo e são enzimas pertencentes a duas grandes famílias de proteínas, as proteínas GSTs solúveis e as proteínas MAPEG (*Membrane Associated Proteins in Eicosanoid in Glutathione Metabolism*). As GSTs solúveis são compostas por dímeros de subunidades com 25 kDa, o que corresponde a cerca de 199 a 244 amino-ácidos de comprimento. As subunidades das GSTs revelam uma zona N-terminal, de domínio α/β , que forma a zona de ligação da glutathione, e uma segunda região, domínio α -hélice, que forma a zona de ligação do substracto electrofílico.

A maioria das enzimas apenas catalisa uma reacção, contudo, as enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos, como é o caso das GSTs, são capazes de catalisar a biotransformação de inúmeros substratos com diferentes grupos funcionais [70].

As GSTs estão divididas em três grandes famílias presentes no citosol, nas mitocôndrias e nos microsomas. As GSTs presentes no citosol são ainda distinguidas,

de acordo com a sequência de aminoácidos, em oito classes, cada uma das quais possui uma ou mais isoformas: Alfa (A), Mu (M), Ómega (O), Pi (P), Sigma (S), Kapa (K), Teta (T) e Zeta (Z) [71].

Muitas outras classes de GSTs foram já identificadas em espécies que não mamíferas, como a Beta, Delta, Epsilon, Lambda, Phi, Tau, mas as GSTs humanas pertencem apenas às classes Alfa (A1-A4), Mu (M1-M5), Ómega (O1-O2), Pi (P1), Sigma (S1), Kapa (K1), Teta (T1-T2) e Zeta (Z1). A numeração árabe designa as subunidades que compõem a GST em questão ou ao tipo de isoenzima. As GSTs pertencentes a uma mesma classe possuem uma semelhança de mais de 60%. Verifica-se uma semelhança de 30% entre classes distintas.

Existem pelo menos 16 subunidades citosólicas de GSTs o que significa que muitas isoenzimas se podem formar a partir da combinação de diferentes subunidades.

Uma vez que as GSTs têm uma grande importância na desintoxicação celular, as variações genéticas foram já alvo de estudos intensivos para muitos investigadores no que diz respeito a risco para cancro, mas não para resposta a terapêutica.

Devido à elevada expressão e facilidade de isolamento, as classes Alfa, Mu e Pi das GSTs foram mais estudadas do que qualquer outra classe das GSTs [70].

1.2.2.1. Polimorfismos nos genes humanos das Glutathione S-Transferases

Quando as formas alternativas de um gene ou de uma sequência intergénica têm uma frequência igual ou superior a 1% numa população, são designadas como polimorfismos de ADN. Os polimorfismos são considerados variações normais numa população, pelo que nenhuma das formas afecta significativamente o seu portador. No que respeita aos genes, cerca de um terço apresenta sequências polimórficas.

Os polimorfismos de ADN são herdados de uma forma mendeliana e são fonte de grande diversidade entre indivíduos. As mutações que ocorrem em ADN intergénico (não codificante), por não estarem habitualmente associadas a pressão de selecção, estão na base de um maior polimorfismo observado nestas regiões do genoma. As sequências de ADN codificantes, em que ocorram mutações silenciosas ou mutações *missense*, que não afectem de modo significativo a função da proteína, também podem ser mantidas numa população como polimorfismo [72].

Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são polimorfismos que assentam na mutação de um único nucleótido. No genoma humano haverá cerca de 12 a 16 milhões de SNPs. Os SNPs parecem ser responsáveis pela maior parte da variabilidade genética humana entre indivíduos. Nesta variabilidade inclui-se a diversidade de respostas individuais a uma mesma terapêutica [73].

ENQUADRAMENTO TEÓRICO

O genoma humano codifica pelo menos 18 enzimas GST que são efectivamente expressas [70]. As GSTs humanas citosólicas apresentam polimorfismos genéticos (Tabela 3.) e estas variações podem aumentar a susceptibilidade na carcinogénese, em doenças inflamatórias e na resposta a xenobióticos [71].

Tabela 3. Polimorfismos conhecidos das GSTs humanas presentes no citosol (adaptado de Hayes *et al.* 2000 [74]).

Classe	Alelo	Localização nucleotídica no gene	Alteração proteica	Localização cromossomal
Alfa	GSTA1*A	-631T/G, -567T, -69C, -52G	Níveis proteicos de "referência"	6p12.1
	GSTA1*B	-631G, -567G, -69T, -52A	Níveis baixos de proteína	
	GSTA2*A	328C, 335G, 588G, 629A	Pro ¹¹⁰ , Ser ¹¹² , Lis ¹⁹⁶ , Glu ²¹⁰	
	GSTA2*B	328C, 335G, 588G, 629C	Pro ¹¹⁰ , Ser ¹¹² , Lis ¹⁹⁶ , Ala ²¹⁰	
	GSTA2*C	328C, 335C, 588G, 629A	Pro ¹¹⁰ , Thr ¹¹² , Lis ¹⁹⁶ , Glu ²¹⁰	
	GSTA2*D	328C, 335G, 588T, 629C	Pro ¹¹⁰ , Ser ¹¹² , Asn ¹⁹⁶ , Ala ²¹⁰	
GSTA2*E	328T, 335G, 588G, 629A	Ser ¹¹⁰ , Ser ¹¹² , Lis ¹⁹⁶ , Glu ²¹⁰		
Mu	GSTM1*A	519G	Lis ¹⁷³	1p13.3
	GSTM1*B	519G	Asn ¹⁷³	
	GSTM1*0	delecção do gene	Nenhuma proteína expressa	
	GSTM1*1x2	duplicação do gene	Sobrexpressão da proteína M1	
	GSTM3*A	<i>wild-type</i>	Níveis proteicos de "referência"	
	GSTM3*B	delecção de 3pb no intrão 6	Proteína inalterada	
	GSTM4*A	<i>wild-type</i>	Níveis proteicos de "referência"	
	GSTM4*B	alteração T2517C no intrão	Proteína inalterada	
Pi	GSTP1*A	313A, 341C, 555C	Ile ¹⁰⁵ , Ala ¹¹⁴ , Ser ¹⁸⁵	11q13
	GSTP1*B	313G, 341C, 555T	Val ¹⁰⁵ , Ala ¹¹⁴ , Ser ¹⁸⁵	
	GSTP1*C	313G, 341T, 555T	Val ¹⁰⁵ , Val ¹¹⁴ , Ser ¹⁸⁵	
	GSTP1*D	313A, 341T	Ile ¹⁰⁵ , Ala ¹¹⁴	
Sigma	GSTS1*A	IVS2 + 11 A	Níveis proteicos de "referência"	4q22.3
	GSTS1*B	IVS2 + 11 C	Proteína inalterada	
Teta	GSTT1*A	<i>wild-type</i>	Níveis proteicos de "referência"	22q11.23
	GSTT1*0	delecção do gene	Nenhuma proteína expressa	
	GSTT2*A	415A	Met ¹³⁹	
	GSTT2*B	4154G	Ile ¹³⁹	
Zeta	GSTZ1*A	94A, 124A, 245C	Lis ³² , Arg ⁴² , Thr ⁸²	14q24.3
	GSTZ1*A	94A, 124G, 245C	Lis ³² , Gli ⁴² , Thr ⁸²	
	GSTZ1*A	94G, 124G, 245C	Glu ³² , Gli ⁴² , Thr ⁸²	
	GSTZ1*A	94G, 124G, 245T	Glu ³² , Gli ⁴² , Met ⁸²	
Ómega	GSTO1*A	419C, 464-IVS4 + 1AAG	Ala ¹⁴⁰ , Glu ¹⁵⁵	10q25.1
	GSTO1*B	419C, delecção 464	Ala ¹⁴⁰ , delecção Glu ¹⁵⁵	
	GSTO1*C	419A, 464-IVS4 + 1 AAG	Asp ¹⁴⁰ , Glu ¹⁵⁵	
	GSTO1*D	419A, delecção 464	Asp ¹⁴⁰ , delecção Glu ¹⁵⁵	
	GSTO2*A	424A	Asn ¹⁴²	
	GSTO2*B	424G	Asp ¹⁴²	

A- Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T- Timina; Ala- Alanina; Arg- Arginina; Asn-Asparagina; Asp- Aspartato; Gli- Glicina; Glu- Glutamato; Ile- Isoleucina; Lis- Lisina; Met- Metionina; Pro- Prolina; Ser- Serina; Thr- Treonina; Val- Valina; IVS- *intervening sequence* (sequência de ácidos nucleicos que não está presente no produto final do gene).

Os polimorfismos das GSTs (Figura 5.) resultam em proteínas activas com diferentes actividades ou níveis de expressão, excepto no caso dos génotipos nulos, GSTM*0 e GSTT*0 [75], onde os indivíduos portadores não expressam uma proteína catalítica activa. Por outro lado, a deleção de genes e a metilação de promotores resultam no défice ou alteração da expressão proteica. Modificações pós-transcricionais alteram a estabilidade e/ou função das proteínas, o que provoca alterações na sinalização e actividade enzimáticas. A interacção entre os genes das GSTs ou entre estes e outros genes pode potenciar o efeito, ou compensar a falta, de uma GST por regulação da expressão de genes. A interacção das GSTs com outras proteínas pode comprometer a actividade proteica destas.

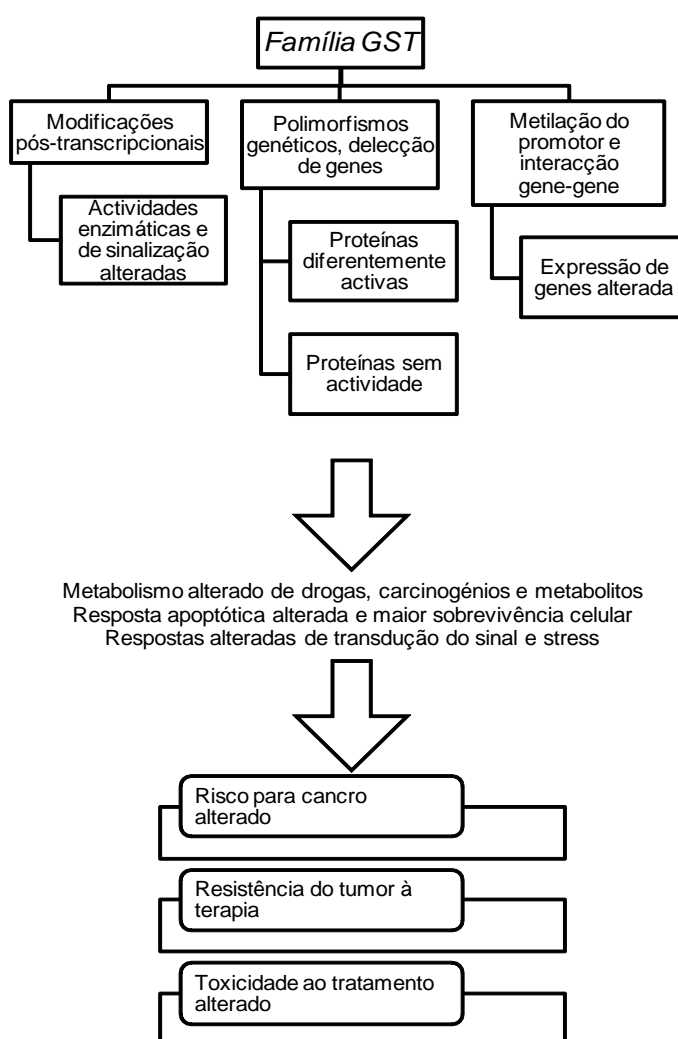


Figura 5. Estrutura das GSTs, regulação, função e sua relação com risco para cancro e resposta à terapia (daptado de Lo *et al.* 2007 [76]).

Devido aos factos acima referidos, os processos celulares, como o metabolismo da fase II, sinalização, resposta ao stress, apoptose ou sobrevivência celular são afectados, levando em última instância a risco alterado para cancro, pior resposta à

terapia e severidade da toxicidade dos tecidos normais relacionada com o tratamento [76].

Uma vez que as enzimas GSTs têm especificidades de substratos que se sobrepõem, o déficit de uma determinada isoforma de GST pode ser compensada por outra isoenzima. Assim, o estudo simultâneo dos vários genótipos das GSTs parece ser necessário para uma boa interpretação do papel desta família de enzimas no cancro [77].

1.2.2.1.1. GSTA1

A classe alfa de genes das Glutathione S-Transferase, localizada na zona 12.1 do braço curto do cromossoma 6 (Figura 6.), é a classe de GSTs mais expressa no fígado.

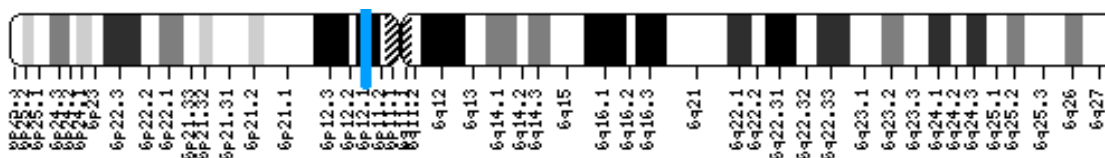


Figura 6. Cromossoma humano 6 com região 12.1, do gene GSTA1, em destaque (imagem obtida em *The National Center for Biotechnology Information*).

Para além de metabolizar a bilirrubina e alguns medicamentos utilizados para tratamento do cancro, no fígado, a classe alfa destas enzimas manifesta actividade de glutathione peroxidase, protegendo as células de espécies reactivas de oxigénio e de produtos da peroxidação.

Os polimorfismos genéticos GSTA1*A e GSTA1*B são caracterizados por substituições *linkage* de três bases na região promotora do gene, nas posições -567, -69 e -52. Estas substituições resultam em diferentes expressões proteicas [78]: activação transcripcional mais baixa no alelo GSTA1*B (variante) do que no alelo GSTA1*A (comum) [79].

Segundo Sweeney *et al*, existe associação entre os genótipos do gene GSTA1 e a sobrevivência após o tratamento do cancro da mama.[80]

1.2.2.1.2. GSTP1

A classe Pi das Glutathione S-Transferase, é a classe mais expressa no cancro humano, codificada apenas por um único gene. O gene GSTP1, situado na zona 13 do

braço longo do cromossoma 11 (Figura 7.), tem cerca de 2,8 kb, sete exões, e codifica uma proteína de 209 aminoácidos (incluindo a metionina iniciadora). [81,82].

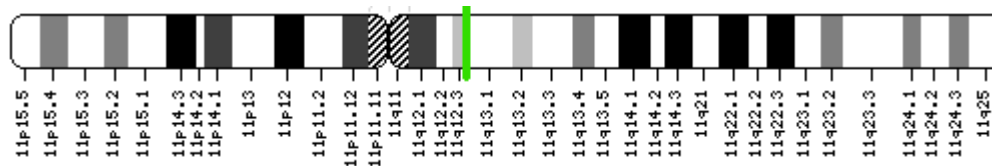


Figura 7. Cromossoma humano 11 com região 13, do gene GSTP1, em destaque (imagem obtida em *The National Center for Biotechnology Information*).

O *locus* GSTP1 é polimórfico em quatro alelos diferentes, GSTP1*A, GSTP1*B, GSTP1*C e GSTP1*D. Estes polimorfismos têm origem em transições nucleótídicas, que levam a alterações no codão 105 do exão 5, do aminoácido Isoleucina (Ile) para Valina (Val), e no codão 114 do exão 6, do aminoácido Alanina (Ala) para Valina (Val) [83,84,85]. A proteína resultante do polimorfismo Ile105Val apresenta propriedades enzimáticas alteradas e actividade catalítica reduzida [83,86].

Foi demonstrado que a expressão do gene GSTP1 no fígado de roedores aumenta após radiação [87], e que a sua sobreexpressão está associada a elevado risco de recidiva em doentes com cancro da mama que recorrem apenas a cirurgia [88].

A enzima do gene GSTP1 é o principal antioxidante tanto na epiderme como na derme da pele [89,90]. A deleção deste gene em cobaias resultou numa elevada susceptibilidade a tumores benignos da pele induzidos por toxinas [91].

Verificou-se em estudos anteriores do cancro da mama, que as ilhas CpG, no promotor do gene GSTP1, não são metiladas nas células normais da mama, mas hipermetiladas em, aproximadamente, um terço dos tumores primários [92].



OBJECTIVOS

2. Objectivos

2.1. Objectivo Geral

O objectivo principal desta dissertação de Mestrado foi avaliar a possível influência dos polimorfismos -567T/G, -69C/T, -52G/A e Ile105Val das enzimas Glutathione S-transferases, nos genes GSTA1 e GSTP1, no valor preditivo de resposta à terapia do cancro da mama.

2.2. Objectivos específicos

Como objectivos específicos delineou-se:

- realizar a análise da frequência dos polimorfismos propostos nos genes GSTA1 e GSTP1 das Glutathione S-transferases, na população em estudo, através das técnicas de PCR-RFLP e RT-PCR, respectivamente, (no caso dos doentes tratados com radioterapia os polimorfismos nos genes GSTA1 e GSTP1 e no caso de doentes tratados com hormonoterapia, apenas o polimorfismo no gene GSTP1);
- analisar as diferentes reacções agudas da pele, da população em estudo tratada com radioterapia, segundo a escala de RTOG *Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria* e associação das mesmas com os polimorfismos nas GSTs;
- verificar e avaliar a existência de associações entre as variantes alélicas do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, e a sobrevivência global após o tratamento com hormonoterapia;
- verificar e avaliar a existência de associações entre as variantes alélicas dos diferentes polimorfismos com a resposta global e completa dos doentes ao tratamento;
- definir subgrupos de indivíduos com cancro da mama, consoante o seu perfil genómico para as GSTs, para desenvolvimento de estratégias individuais de tratamento, para que estes alcancem uma máxima eficácia.



**MATERIAL E
MÉTODOS**

3. Material e Métodos

3.1. Desenho experimental geral

A Figura 8. representa esquematicamente todo o trabalho prático efectuado para o estudo da influência dos polimorfismos das enzimas glutationa S-transferases na resposta à terapia do cancro da mama.

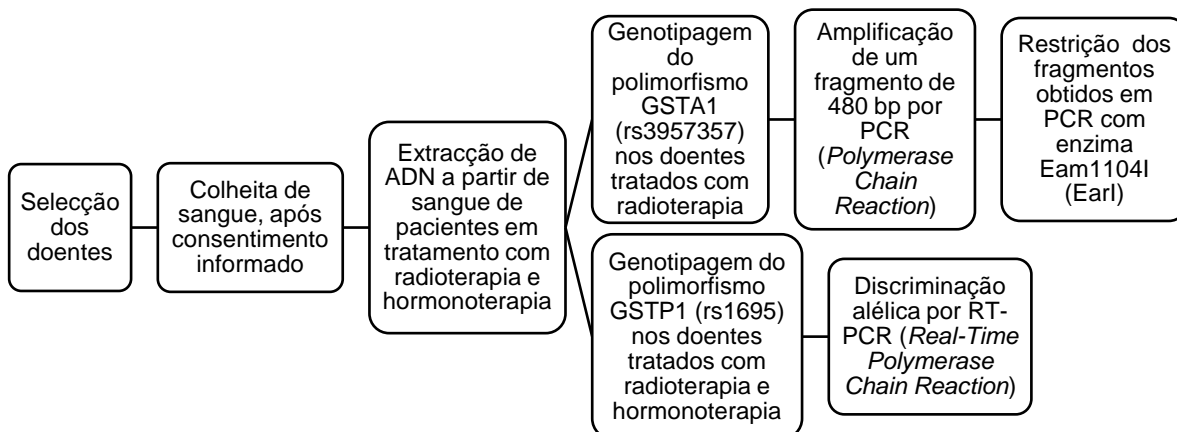


Figura 8. Esquema figurativo do trabalho realizado para elaboração do estudo dos polimorfismos GSTP1 e GSTA1 e a sua relação com resposta à terapia do cancro da mama.

3.2. População

Para a realização do estudo, do tipo caso-controlo, da influência dos polimorfismos, nos genes GSTA1 e GSTP1, na resposta à radioterapia, foram utilizadas amostras biológicas provenientes de 100 indivíduos com cancro da mama, residentes na região Norte de Portugal, admitidos e tratados com radioterapia no Instituto Português de Oncologia do Porto – Dr. Francisco Gentil, E.P.E., entre Maio de 2009 e Maio de 2011.

Foram utilizadas ainda 88 amostras biológicas provenientes de mulheres submetidas a cirurgia e tratadas com hormonoterapia no Instituto Português de Oncologia do Porto – Dr. Francisco Gentil, E.P.E., entre Dezembro de 2002 e Abril de 2007, para o estudo, do tipo caso-controlo, da influência do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, na resposta à terapia do cancro da mama.

3.3. Selecção dos doentes

3.3.1. Estudo da influência dos polimorfismos -567T/G, -69C/T, -52G/A e Ile105Val, nos genes GSTA1 e GSTP1, na resposta à terapia em doentes tratados com radioterapia

A selecção dos doentes para o desenvolvimento do estudo dos polimorfismos, nos genes GSTA1 e GSTP1, e resposta à radioterapia teve os seguintes critérios:

- doentes previamente submetidos a cirurgia conservadora da mama, exérese completa;
- doentes não submetidos previamente a quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante ou adjuvante;
- doentes submetidos ou não a hormonoterapia;
- doentes sem antecedentes de doenças de pele ou auto-imunes;
- doentes sem contra-indicações para radioterapia.

A Tabela 4. descreve a amostra em estudo e inclui alguns dados relativos à patologia do carcinoma da mama dos indivíduos tratados com radioterapia.

Tabela 4. Caracterização da amostra dos indivíduos tratados com radioterapia.

		n (N=100) / %
Género	Masculino	1
	Feminino	99
Raça	Caucasiana	99
	Asiática	1
Idade Mediana (anos, intervalo)		64 (42-81)
IMC Mediano (kg/m², intervalo)		26,55 (20,28-36,85)
Fototipo	Tipo I	1
	Tipo II	35
	Tipo III	44
	Tipo IV	18
	Sem informação	2
Tamanho mama (copa)	A	1
	B	58
	C	29
	D	8
	Sem informação	4
Estadio	0	11
	I	85
	II	4
T	1	97
	2	3
N	0	98
	1	2

IMC- Índice de massa corporal; T- -extensão do tumor primário; N- metástase no gânglio linfático regional.

Na amostra analisada, 99% desta é constituída por indivíduos do sexo feminino, bem como de raça caucasiana. Metade dos indivíduos em estudo tem mais de 64 anos e outra metade menos, sendo a idade máxima verificada de 81 anos e a mínima de 42. Relativamente ao índice de massa corporal (IMC), metade da amostra tinha um valor superior a 26,55 e outra metade inferior, tendo como valor máximo 36, 85 e mínimo 20,28.

Quanto ao fototipo, não se obteve informação de apenas dois indivíduos. Em 1% da amostra é observado o fototipo do tipo I, 35% do tipo II, 44% tipo III e 18% do tipo IV.

Para o parâmetro do tamanho da mama, não se reuniu informação de 4 indivíduos. Em 1%, 58%, 29% e 8% da amostra, têm um tamanho de mama que corresponde, respectivamente, a uma copa A, B, C e D.

Quanto ao estadiamento dos indivíduos em estudo, a 11% foi diagnosticada doença de estadiamento 0, 85% estadiamento I e apenas 4% estadiamento II.

Relativamente à classificação do tumor, 97% da amostra em análise estava inserida no T1 e 3% T2. Na classificação dos nódulos linfáticos, 98% apresentou nódulos livres de doença (N0) e 2% não (N1).

A Tabela 5. mostra alguns detalhes da cirurgia e da patologia dos indivíduos tratados com radioterapia.

Tabela 5. Detalhes da cirurgia e patologia dos doentes tratados com radioterapia incluídos no estudo.

		n (N=100)/%
Tipo Cirurgia	TA	10
	TA+PGS	81
	TA+Alarg.	6
	TA+EA	3
Infecção pós-operatória	Sim	10
	Não	90
Deiscência	Sim	3
	Não	97
Seroma	Sim	10
	Não	90
Receptores hormonais	RE+/RP+	87
	RE-/RP-	3
	RE+/RP-	2
	Sem informação	8
cerB₂	Positivo	5
	Negativo	72
	Sem informação	23

TA- Tumorectomia; PGS- Pesquisa de Gânglio Sentinela; Alarg.- Alargamento; EA- Esvaziamento Axilar; RE- Receptores de Estrogénio; RP- Receptores de Progesterona.

Todos os doentes foram submetidos a cirurgia conservadora da mama. Cerca de 10% dos indivíduos foi submetido a uma tumorectomia, 81% a uma tumorectomia com pesquisa do gânglio sentinela, 6% realizou uma tumorectomia com alargamento e apenas 3% dos indivíduos foi submetido a uma tumorectomia com esvaziamento axilar.

Apenas 10% dos doentes desenvolveu infecção pós-operatória, 3% deiscência e 10% seroma.

Quanto à presença de receptores hormonais, 87% apresentava receptores positivos para estrogénio e progesterona, 3% não eram negativos para ambas as hormonas e 2% positivos para estrogénios, mas negativos para progesterona.

Relativamente à expressão do cerB₂, esta não foi doseada em 23% da amostra. 5% dos indivíduos expressava cerB₂ e 72% não.

Como se pode observar na Tabela 6., 65% da amostra realizou radioterapia com uma energia de 4Mv e 35% com 6 Mv. Apenas 33% dos doentes não efectuou uma dose adicional de radioterapia.

A mediana de dias de tratamento foi de 39 dias, sendo que o tratamento mais curto durou 27 dias e o mais longo 59.

Apenas 2 indivíduos interromperam o tratamento de radioterapia.

Tabela 6. Detalhes do tratamento de radioterapia.

		n (N=100)/%
Energia	4Mv	65
	6Mv	35
Boost	Sim	67
	Não	33
Duração Tratamento (dias, intervalo)		39 (27-59)
Interrupção	Sim	2
	Não	98

Boost- dose adicional de radioterapia.

3.3.2. Estudo da influência do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, na resposta à terapia de doentes tratados com hormonoterapia

A selecção dos doentes para o desenvolvimento do estudo do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, e resposta à terapia em doentes tratados com hormonoterapia teve como critérios de inclusão indivíduos tratados com cirurgia e, após esta, tratados com hormonoterapia.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os doentes incluídos são do sexo feminino. Cerca de 25,6% das mulheres era pré-menopausica na altura do diagnóstico e 61,1% pós-menopausica. A idade mediana da amostra foi de 56 anos, sendo a idade mínima de 29 anos e máxima de 77 anos. Quanto à distribuição por estadios, a 71,6% das mulheres foi atribuído os estadios I e II, e a cerca de 28,4% os estadios III e IV. Relativamente ao tamanho do tumor, 58,0% da amostra apresentou um tumor de dimensões superiores a 20mm e 44,3% inferiores. Cerca de 77,3% da amostra obteve uma classificação N0/N1 dos nódulos linfáticos e 25,0% N2/N3. Em 97,7% das doentes foram detectadas metástases à distância, mas em 2,3% não (Tabela 7.).

Tabela 7. Descrição da amostra das doentes tratadas com hormonoterapia, incluídas no estudo.

		n (N=88)	%
Situação hormonal	Pré-menopausica	23	26,1
	Pós-menopausica	55	62,5
	Sem informação	10	11,4
Idade Mediana (anos, intervalo)		56 (29-77)	
História familiar de cancro	Sim	25	28,4
	Não	45	51,1
	Sem informação	18	20,5
Estadio	IA	24	27,3
	IIA	24	27,3
	IIB	15	17,0
	IIIA	15	17,0
	IIIB	1	1,1
	IIIC	7	8,0
	IV	2	2,3
			0,0
	VII	63	71,6
	III/IV	25	28,4
Tamanho tumor (mm)	<20	39	44,3
	>20	51	58,0
N	N0/N1	68	77,3
	N2/N3	22	25,0
M	M0	86	97,7
	M1	2	2,3

N-nódulo; M-metástases à distância

Os dados histológicos obtidos, revelaram que 76,1% das doentes tinha um tumor de grau um ou dois e 22,7% de grau três. Todas as mulheres tinham receptores de

estrogénio positivos, o que justifica o facto de terem sido aconselhadas a realizarem hormonoterapia. Das doentes, 80,7% apresentou receptores de progesterona positivos e 20,5% não. Finalmente, quanto à expressão de $cerB_2$, apesar de não ter sido reunida informação de 60 indivíduos, 15,9% mostraram positividade e a mesma percentagem negatividade (Tabela 8.).

Tabela 8. Dados histológicos dos doentes tratados com hormonoterapia incluídos no estudo.

		n (N=88)	%
Grau Histológico	G1/G2	67	76,1
	G3	20	22,7
	Sem informação	1	1,1
Receptores Estrogénio +		88	100,0
Receptores Progesterona	+	71	80,7
	-	18	20,5
	Sem informação	1	1,1
cerB₂	+	14	15,9
	-	14	15,9
	Sem informação	60	68,2

Para além de hormonoterapia, as mulheres incluídas no estudo realizaram outros esquemas de tratamento. Apenas 9,1% das doentes realizou hormonoterapia isolada, sem outro tratamento adicional, 17,0% realizou hormonoterapia combinada com radioterapia, 5,7% hormonoterapia conjugada com quimioterapia e, finalmente, 68,2% das mulheres efectuou hormonoterapia, radioterapia e quimioterapia. Não foi possível reunir informação sobre os esquemas específicos de cada tratamento. Na hormonoterapia, as mulheres foram tratadas com inibidores de aromatase (51,1% letrozole e 47,7% exemestano). Quanto ao estado de sobrevivência, 10 doentes faleceram e 78 sobreviveram, até ao final do estudo (Tabela 9.).

Tabela 9. Detalhes do tratamento do cancro da mama e estado de sobrevivências dos indivíduos tratados com hormonoterapia.

		n (N=88)	%
Esquema de tratamento	HT	8	9,1
	HT+RT	15	17,0
	HT+QT	5	5,7
	HT+QT+RT	60	68,2
Tipo tratamento HT	Letrozole	45	51,1
	Exemestano	42	47,7
	Sem informação	1	1,1
Estado sobrevivência	Sobrevivente	78	88,6
	Morte	10	11,4

HT- hormonoterapia; RT- radioterapia; QT- quimioterapia

3.4. Colheita das amostra de sangue para pesquisa dos polimorfismos genéticos nos genes GSTA1 e GSTP1

Na primeira consulta, de pré-tratamento, foi explicado a cada doente o intuito do projecto e solicitada a sua colaboração. Nos casos em que os doentes aceitaram, estes assinaram um consentimento informado e foram sujeitos a uma colheita de sangue juntamente com o hemograma rotineiro de pré-tratamento.

Foram recolhidos 8 ml de sangue periférico.

3.5. Isolamento de ADN genómico

O ADN foi extraído a partir de 1,5 ml de sangue total, das células nucleadas de sangue periférico. Para isso, utilizou-se o Qiagen®, QIAmp® DNA Blood Mini Kit, (Qiagen® 51106) e seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante.

O ADN extraído foi armazenado a uma temperatura de -20 °C.

3.6. Genotipagem do polimorfismo -567T/G, -69C/T, -52G/A no gene GSTA1

A caracterização do polimorfismo GSTA1 foi realizada com o recurso à técnica de *Polymerase Chain Reaction – Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP)*.

A sequência dos *primers* utilizados para PCR foi a de acordo com Coles *et al.* [93]:

- *Forward*, 5'-TGT TGA TTG TTT GCC TGA AAT T-3';
- *Reverse*, 5'-GTT AAA CGC TGT CAC CCG TCC T-3'.

Para a amplificação dos fragmentos de ADN de cada caso e para um volume de reacção de 50 μ l, foram utilizados 5 μ l de tampão de reacção de PCR (1x) (Fermentas), 2,5mM de $MgCl_2$ (Fermentas), 0,2mM de dNTPs (dinucleosídeos trifosfato) (Fermentas), 0,3 μ M de cada um dos primers, *Forward* e *Reverse*, 5U de *Taq DNA Polymerase* (Fermentas), 33,8 μ l de H_2O e 2 μ l de ADN, que correspondem a cerca de 20 ng de ADN.

As condições de PCR consistiram num tempo de 10 minutos a 94°C para pré-desnaturação, seguidos de 38 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 59°C para emparelhamento dos *primers* e 2 minutos a 72°C para extensão, finalizados com 10 minutos de extensão final a 72°C. Para a realização destas reacções foi utilizado um termociclador programável (Biometra).

O produto de PCR foi separado num gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo. As bandas obtidas (Figura 9.) foram analisadas com o *software Quantity One* (BioRad), recorrendo a um transiluminador Gel DocXR, Biorad®.

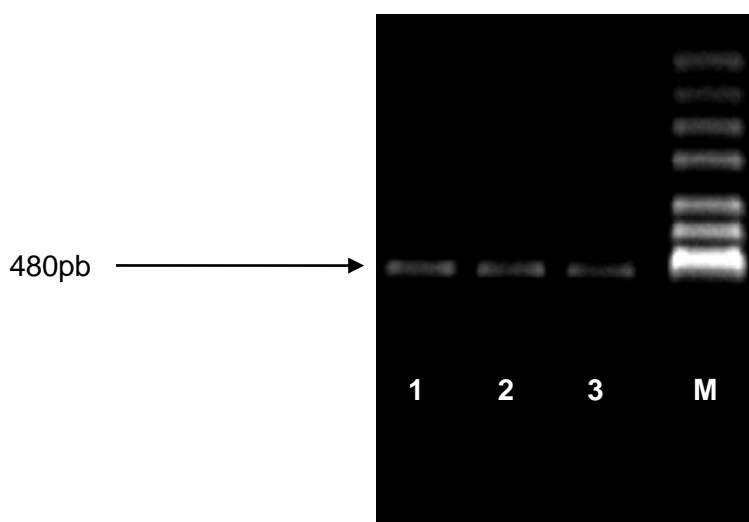


Figura 9. Gel de agarose a 1,5% (p/v). A letra M identifica o marcador utilizado. As amostras 1,2 e 3 exemplificam a banda de 480pb obtida por PCR que corresponde à região amplificada do gene GSTA1.

Após a corrida no gel de agarose, as amostras positivas para uma banda de 480 pares de bases (pb) de comprimento foram submetidas a uma digestão com a enzima de restrição Eam1104I (EarI) (Fermentas), segundo indicações fornecidas pelo fabricante.

As enzimas de restrição reconhecem sequências específicas de ADN em cadeia dupla, tipicamente constituídas por sequências de 4 ou 6 nucleotídeos. A sequência reconhecida pela enzima Eam1104I (EarI) é 5'...CTCTTC(N)₁↓...3'/3'...GAGAAG(N)₄↑...5', sendo que N representa nucleotídeos pertencentes às cadeias de ADN.

Assim, foram usados 18 µl de H₂O, 2 µl de Buffer Tango™ 10X (Fermentas), 5 U de Eam1104I (Earl) e 10 µl de produto de PCR. A incubação foi realizada a 37°C durante 12 horas (overnight).

A análise dos produtos obtidos após a digestão dos fragmentos de ADN em estudo com a enzima Eam1104I (Earl), realizou-se com recurso a electroforese em gel de agarose a 3% (p/v), corado com brometo de etídeo. Os alelos GSTA1*A e GSTA1*B apresentam-se sob a forma de 1 banda de 480 pb e 2 bandas de 380 pb e 100 pb, respectivamente (Figura 10.).

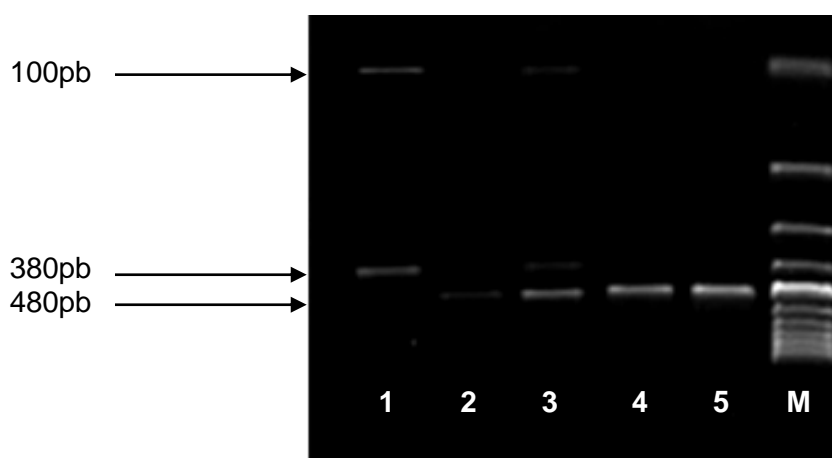


Figura 10. Gel de agarose a 3% (p/v) que exemplifica os três perfis de RFLP obtidos. A letra M identifica o marcador utilizado. O caso 1 é homocigótico para o alelo GSTA1*B (380+100pb). Os casos 2,4 e 5 são homocigóticos para o alelo GSTA1*A (480pb). O caso 3 é heterocigótico (480+380+100pb).

Realizaram-se duplicados em 10% das amostras, de forma aleatória, para controlo de qualidade dos resultados da genotipagem.

3.7. Genotipagem do polimorfismo *Ile105Val* no gene *GSTP1*

A caracterização do polimorfismo *Ile105Val*, no gene *GSTP1*, fez-se por *Real-Time* PCR (RT-PCR). Para tal, realizou-se um protocolo de discriminação alélica que tem por base a utilização de um par de *primers* ou sondas específicos que detectam variações em apenas um único nucleótido de uma determinada sequência de ADN. A presença desses dois *primers* ou par de sondas em cada reacção possibilitou a genotipagem das duas variantes do SNP em estudo [94,95]. É de salientar contudo, que a quantidade real da sequência em estudo não é, neste caso, determinada.

Assim, em cada amostra, adicionou-se um único par de sondas marcadas com fluorescência que têm como alvo os dois alelos do polimorfismo Ile105Val no gene GSTP1. Uma sonda emparelha perfeitamente com o alelo *wild type* (¹⁰⁵Ile) e a outra com o alelo variante (¹⁰⁵Val). Por discriminação alélica foi possível classificar amostras desconhecidas como homocigóticas, tanto para o alelo ¹⁰⁵Ile, como para o alelo ¹⁰⁵Val, ou como heterocigóticas, quando as amostras apresentaram ambos alelos.

A classificação dos alelos é realizada através da medição de emissão de fluorescência por parte das sondas. Se estas emparelham, o marcador fluorescente repórter ligado à extremidade 5' da sonda separa-se, por acção da enzima *Taq* Polimerase, e emite sinal que o aparelho identifica e atribui como sendo ou o alelo *wild-type* ou o alelo variante (Figura 11.).

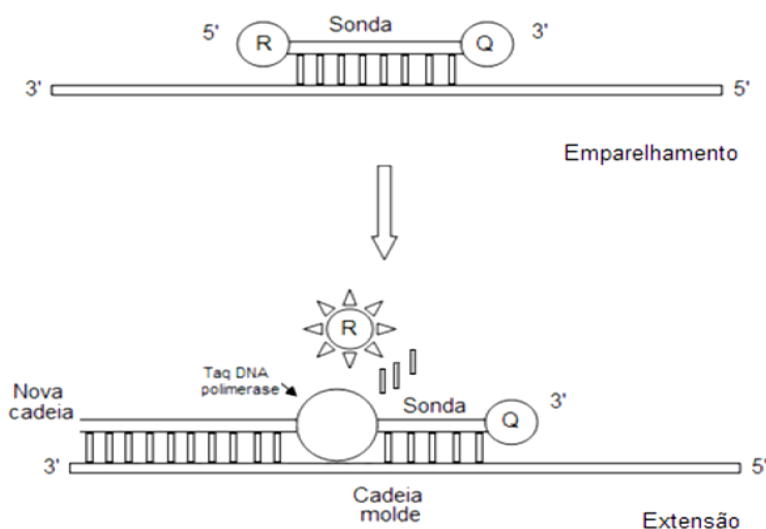


Figura 11. Representação esquemática da emissão de fluorescência detectada para discriminação alélica. As sondas utilizadas possuem um fluoróforo na extremidade 5' (R), cuja fluorescência está a ser absorvida pelo *quencher* (Q) na extremidade 3'. Por hidrólise da sonda, causada pela actividade da *Taq* ADN polimerase quando está a realizar a extensão da nova cadeia, estas duas moléculas afastam-se o suficiente para que possa ser detectada a emissão de fluorescência.

Numa placa de 96 poços e para um volume final de 5 µl, adicionaram-se em cada poço 2,375 µl de H₂O, 2,5 µl de TaqMan® *Universal PCR Master Mix* (2X) e 0,125 de *SNP Genotyping Assay Mix* (20X) (rs1695). Para cada ensaio, adicionou-se ainda 1 µl de ADN de cada amostra, num poço respectivo, excepto em 4 controlos negativos.

Em cada reacção, obteve-se um gráfico como o representado na Figura 6., através da interpretação da detecção de emissões de fluorescência ao longo da amplificação (Figura 12.).

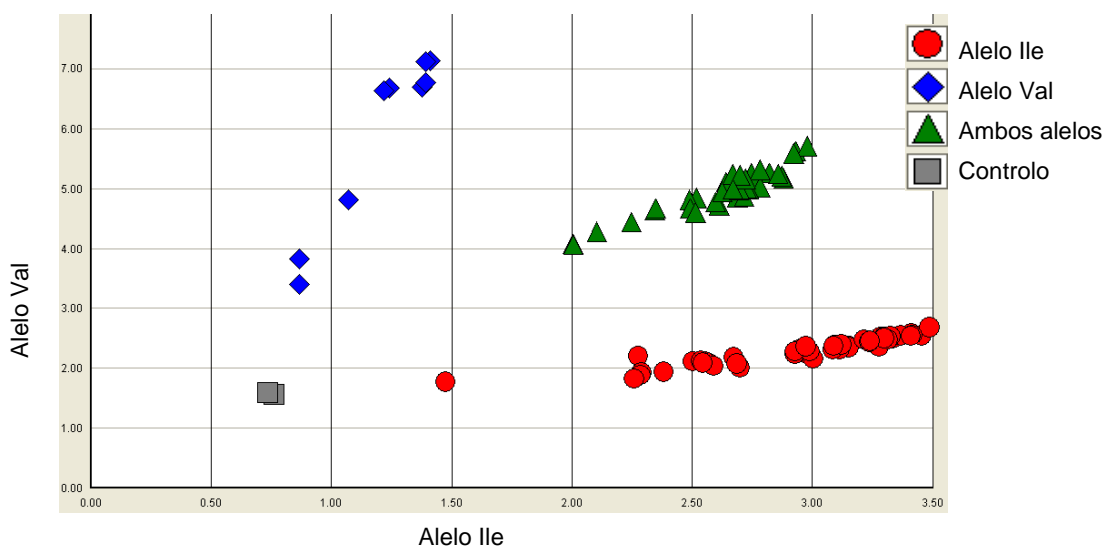


Figura 12. Gráfico que exemplifica a discriminação alélica obtida, do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, num ensaio de RT-PCR.

Se ambas as sondas emitem fluorescência, na reacção de RT-PCR, isso significa que as duas se ligaram durante a amplificação à sequência de ADN em estudo e que houve clivagem, por acção da *Taq* ADN polimerase, dos fluoróforos situados na extremidade 5', tanto da sonda desenhada para o alelo ¹⁰⁵Ile, como da sonda desenhada para o alelo ¹⁰⁵Val. Neste caso, a amostra em questão é heterozigótica, de genótipo ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val (Figura 13.A).

Quando se verifica um sinal maior de fluorescência, emitida pela sonda do alelo ¹⁰⁵Ile, as amostras são homozigóticas para esse alelo (Figura 13.B).

Se por outro lado, a sonda a emitir maior sinal de fluorescência for a correspondente ao alelo ¹⁰⁵Val, as amostras são classificadas como homozigóticas de genótipo ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val (Figura 13.C).

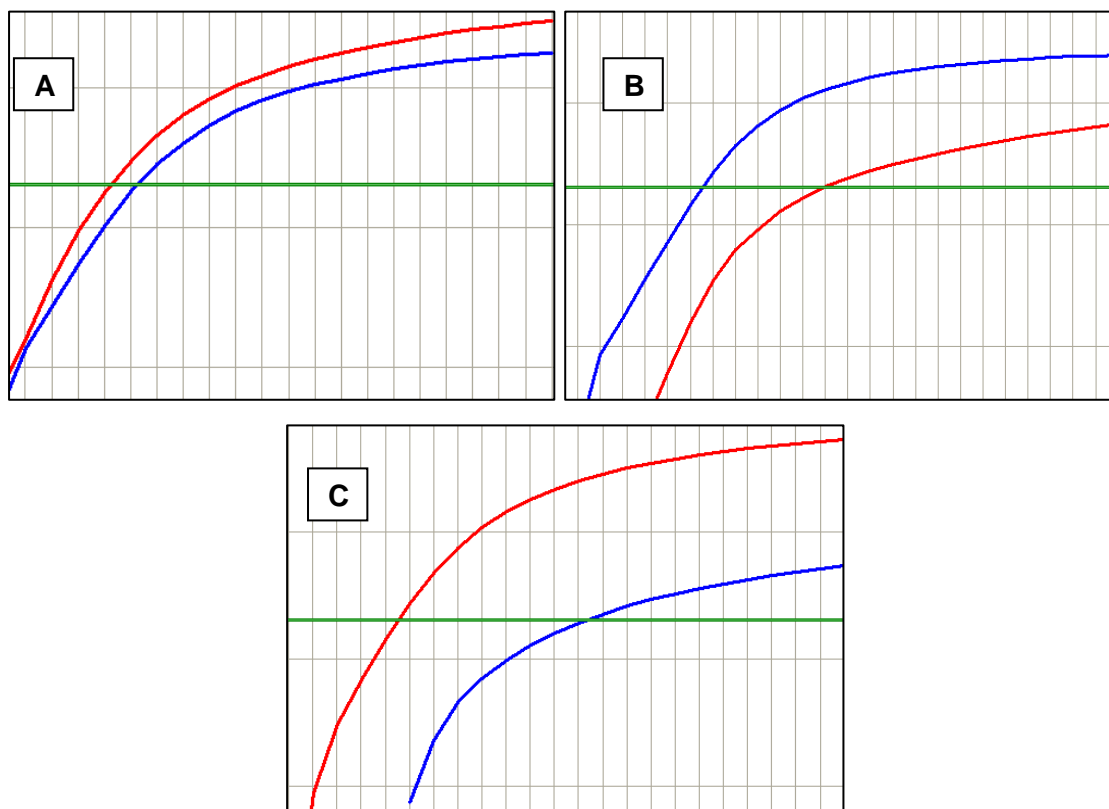


Figura 13. Imagens figurativas da discriminação alélica por RT-PCR para os três genótipos do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1. A, B e C apresentam a emissão de fluorescência (eixo Y) ao longo do número de ciclos da amplificação (eixo X) de três amostras diferentes com os genótipos Ile /Val Ile/Ile, e Val/Val, respectivamente. A linha azul, corresponde à leitura da fluorescência da sonda do alelo Ile e a linha vermelha do alelo Val.

Cerca de 10% das amostras foram novamente genotipadas, para comparação com os resultados obtidos na análise feita inicialmente.

3.8. Análise estatística

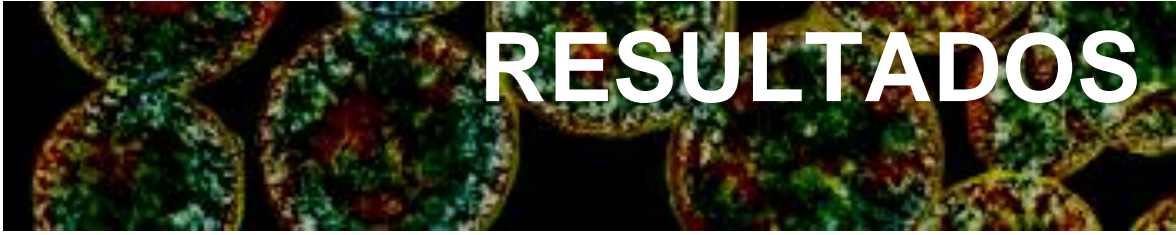
A análise estatística dos resultados foi efectuada com o auxílio do *software* estatístico SPSS® (Versão 13.0, ©2004 SPSS Inc.).

O estudo pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2) foi utilizado para análise de associação entre duas variáveis categóricas. O valor de p foi obtido pelo teste de χ^2 , ou pelo teste de Fisher quando o número de indivíduos considerados em cada teste foi inferior a 5. Quando p foi inferior a 0,05 este foi considerado estatisticamente significativo.

O valor de *Odds Ratio* foi utilizado, neste estudo, com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%), para medir a associação entre os diferentes genótipos dos

polimorfismos nos genes GSTA1 e GSTP1, e os fototipos e resposta à terapia do cancro da mama, na população tratada com radioterapia.

Para a obtenção de curvas de probabilidade de sobrevivência nos doentes tratados com hormonoterapia, foi utilizado o método estatístico de Kaplan–Meier e o teste de *log rank* para a comparação das curvas de sobrevivência, através do valor de *p*.

A horizontal banner image featuring a microscopic view of several cells, likely from a tissue sample, showing various internal structures and colors (green, brown, red). The word "RESULTADOS" is overlaid in large, white, bold, sans-serif capital letters across the center of the image.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Estudo da influência dos polimorfismos nos genes GSTA1 e GSTP1 na resposta à terapia em doentes tratados com radioterapia

Um total de 100 doentes, tratados com radioterapia, foi incluído no estudo do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1. Verificou-se que 40% dos indivíduos era homocigótico para o alelo ¹⁰⁵Ile, 17% homocigótico para o alelo ¹⁰⁵Val e 43% era heterocigótico (Tabela 10.). O alelo ¹⁰⁵Val esteve presente em 60% dos indivíduos e o alelo ¹⁰⁵Ile em 83%, sendo o alelo ¹⁰⁵Ile mais frequente (61,5%).

Tabela 10. Frequências genóticas para o polimorfismo Ile105Val no gene GSTP1 nos doentes tratados com radioterapia.

	n (N=100)	%
Genótipos		
¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile	40	
¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Val	43	
¹⁰⁵ Val/ ¹⁰⁵ Val	17	
Portador alelo ¹⁰⁵ Val	60	
Portador alelo ¹⁰⁵ Ile	83	
Alelos (Total de alelos=200)		
¹⁰⁵ Ile	123	61,5
¹⁰⁵ Val	77	38,5

Foi utilizado o teste de Fisher para obtenção do valor de *p*, para aferição da relação entre as reacções agudas na pele, provocadas pela radioterapia, e os genótipos do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, excepto na segunda semana de seguimento do tratamento, onde se recorreu ao teste χ^2 .

Na associação dos genótipos obtidos, dados mostrados na tabela 9., com as reacções agudas da pele, no tratamento da radioterapia, verificou-se que, apesar de não ser estatisticamente significativo, há uma tendência para os indivíduos portadores do alelo polimórfico ¹⁰⁵Val desenvolverem qualquer tipo de reacção ao longo do tratamento. Para além disso, os doentes homocigóticos para o alelo ¹⁰⁵Ile foram os que tiveram menos reacções agudas, comparativamente com os indivíduos de genótipos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val e ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val (Tabela 11.).

RESULTADOS

Tabela 11. Análise multivariada que relaciona os genótipos agrupados (¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile versus ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val e ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val) do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, com a presença e ausência de reacções agudas na pele, nos doentes tratados com radioterapia ao longo de 7 semanas.

		Reacção		p	OR	95% IC
		Sim n (%)	Não n (%)			
Semana 2	¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile Portador ¹⁰⁵ Val	31 42	9 18	0,408*	0,677	0,269-1,708
Semana 3	¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile Portador ¹⁰⁵ Val	34 56	6 4	0,192**	2,471	0,650-9,388
Semana 4	¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile Portador ¹⁰⁵ Val	37 58	3 2	0,386**	2,351	0,375-14,748
Semana 5	¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile Portador ¹⁰⁵ Val	39 57	1 3	0,648**	0,487	0,049-4,857
Semana 6	¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile Portador ¹⁰⁵ Val	38 59	2 1	0,562**	3,105	0,272-35,443
Semana 7	¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile Portador ¹⁰⁵ Val	37 58	3 2	0,386**	2,351	0,375-14,748

p*- valor de p calculado pelo teste χ^2 ; p** - valor de p calculado pelo teste de Fisher; OR- Odds ratio; 95% IC- Intervalo de confiança a 95%

Relativamente ao estudo do polimorfismo -567T/G, -69C/T, -52G/A, no gene GSTA1, foram analisadas amostras de 87 doentes. Verificou-se que 35,6% dos indivíduos era homozigótico para o alelo GSTA1*A, 18,4% homozigótico para o alelo GSTA1*B e 46% era heterozigótico. 64,4% dos indivíduos era portador do alelo variante GSTA1*B e 81,6% do alelo GSTA1*A (Tabela 12.).

Tabela 12. Frequências genóticas para o polimorfismo no gene GSTA1 nos doentes tratados com radioterapia.

Genótipos	n (N=87)	%
GSTA1*A/*A	31	35,6
GSTA1*A/*B	40	46,0
GSTA1*B/*B	16	18,4
Portador alelo GSTA1*B	56	64,4
Portador alelo GSTA1*A	71	81,6
Alelos (Total de alelos=174)		
GSTA1*A	102	58,6
GSTA1*B	72	41,4

Não se encontrou uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo no gene GSTA1 em estudo e as reacções agudas verificadas nos indivíduos

RESULTADOS

submetidos a radioterapia. Observou-se que os indivíduos portadores do alelo GSTA1*A, tanto são os que têm mais reacções agudas da pele, como são os indivíduos com menos reacções agudas pele (Tabela 13.).

Tabela 13. Análise multivariada que relaciona os genótipos agrupados (GSTA1*B/*B versus GSTA1*A/*B e GSTA1*A/*A) do polimorfismo -567T/G, -69C/T, -52G/A, no gene GSTA1, com a presença e ausência de reacções agudas na pele nos doentes tratados com radioterapia ao longo de 7 semanas.

	Reacção		p	OR	95% IC
	Sim n (%)	Não n (%)			
Semana 2					
GSTA1*B/*B	5 (5,7)	1 (1,1)	1,000**	1,429	0,157-13,023
Portador alelo GSTA1*A	63 (72,4)	18 (20,7)			
Semana 3					
GSTA1*B/*B	5 (5,7)	1 (1,1)	0,450**	0,473	0,48-4,636
Portador alelo GSTA1*A	74 (85,1)	7 (8,0)			
Semana 4					
GSTA1*B/*B	5 (5,7)	1 (1,1)	0,307**	0,260	0,024-2,780
Portador alelo GSTA1*A	77 (88,5)	4 (4,6)			
Semana 5					
GSTA1*B/*B	5 (5,7)	1 (1,1)	0,195**	0,127	0,10-1,646
Portador alelo GSTA1*A	79 (90,8)	2 (2,3)			
Semana 6					
GSTA1*B/*B	5 (5,7)	1 (1,1)	0,134**	0,063	0,003-1,153
Portador alelo GSTA1*A	80 (92,0)	1 (1,1)			
Semana 8					
GSTA1*B/*B	5 (5,7)	1 (1,1)	0,195**	0,127	0,10-1,646
Portador alelo GSTA1*A	79 (90,8)	2 (2,3)			

p** - valor de p calculado pelo teste de Fisher; OR- odds ratio; 95% IC- intervalo de confiança a 95%

Quando comparados os fototipos dos indivíduos com a presença ou ausência de reacções agudas da pele, notou-se uma propensão, sem diferenças estatisticamente significativas, para os doentes que pertencem aos fototipos III e IV virem a desenvolver mais reacções agudas do que os indivíduos de fototipos I e II (Tabela 14.).

Tabela 14. Análise multivariada que relaciona os fototipos agrupados, dos doentes tratados com radioterapia, e a presença e ausência de reacções agudas na pele ao longo de 7 semanas.

	Reacção		P	OR	95% IC
	Sim n (%)	Não n (%)			
Semana 2					
Fototipo I/II	26 (26,5%)	10 (10,2%)	0,969*	1,018	0,406-2,550
Fototipo III/IV	45 (45,9%)	17 (17,3%)			
Semana 3					
Fototipo I/II	31 (31,6%)	5 (5,1%)	0,491**	1,839	0,494-6,845
Fototipo III/IV	57 (58,2%)	5 (5,1%)			
Semana 4					
Fototipo I/II	34 (34,7%)	2 (2,0%)	1**	1,157	0,184-7,272
Fototipo III/IV	59 (60,2%)	3 (3,1%)			
Semana 5					
Fototipo I/II	34 (34,7%)	2 (2,0%)	0,623**	1,765	0,238-13,100
Fototipo III/IV	60 (61,2%)	2 (2,0%)			
Semana 6					
Fototipo I/II	34 (34,7%)	2 (2,0%)	0,552**	3,588	0,314-41,038
Fototipo III/IV	61 (62,2%)	1 (1,0%)			
Semana 7					
Fototipo I/II	32 (32,7%)	4 (4,1%)	0,59**	7,625	0,818-71,102
Fototipo III/IV	61 (62,2%)	1 (1,0%)			

p* - valor de p calculado pelo teste χ^2 ; p** - valor de p calculado pelo teste de Fisher; OR- Odds ratio; 95% IC- Intervalo de confiança a 95%

4.2. Estudo da influência do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, na resposta à terapia em doentes tratados com hormonoterapia

Relativamente à influência do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, foram estudados 88 doentes tratados com hormonoterapia. Observou-se que 47,7 % era portador do genótipo ¹⁰⁵Ile /¹⁰⁵Ile, 42,0% do genótipo ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val e 10,2% do genótipo ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val. O alelo mais frequente foi o alelo ¹⁰⁵Ile, cerca de 89,8% da amostra era portador deste (Tabela 15.).

Tabela 15. Frequências genóticas para o polimorfismo Ile105Val no gene GSTP1 nos doentes tratados com hormonoterapia.

	n (N=88)	%
Genótipos		
¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Ile	42	47,7
¹⁰⁵ Ile/ ¹⁰⁵ Val	37	42,0
¹⁰⁵ Val/ ¹⁰⁵ Val	9	10,2
Portador alelo ¹⁰⁵ Val	46	52,3
Portador alelo ¹⁰⁵ Ile	79	89,8
Alelos (N=176)		
¹⁰⁵ Ile	121	68,8
¹⁰⁵ Val	55	31,3

Traçaram-se curvas de Kaplan-Meier para comparação da rapidez com que os indivíduos de três genótipos diferentes desenvolveram o evento final na análise de sobrevivência.

A relação entre os genótipos do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, e a sobrevivência global dos doentes tratados com hormonoterapia, não revelou ser estatisticamente significativa ($p=0,610$). Verificou-se, no entanto, que os indivíduos homocigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile viveram em média menos 6 meses do que os heterocigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val e que estes últimos, viveram em média menos 18 meses do que os doentes homocigóticos ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val (Figura 14).

RESULTADOS

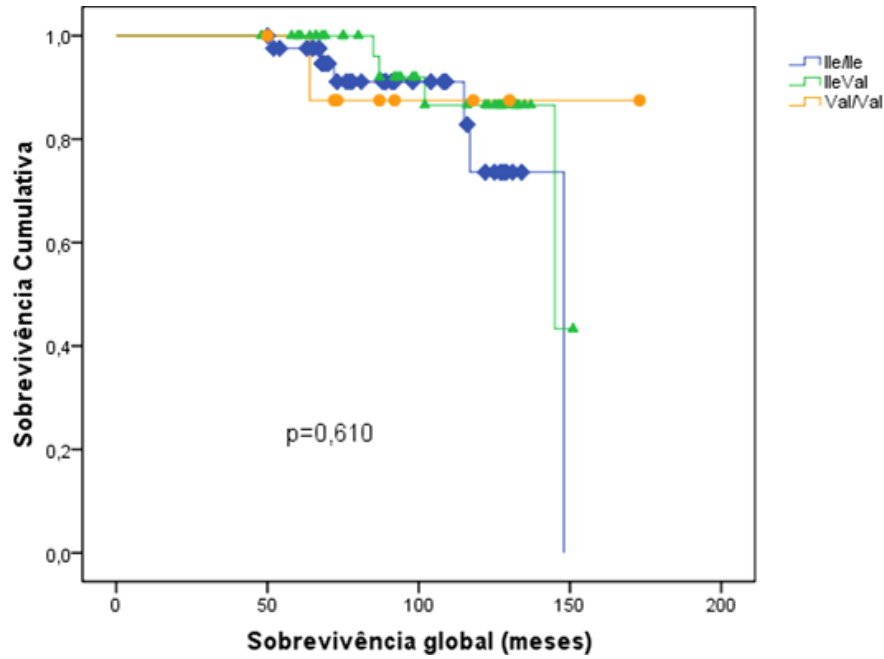


Figura 14. Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevivência global e relação com os três diferentes genótipos do polimorfismo Ile105Val no gene GSTP1 ($^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$, $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$ e $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$). Os casos censurados são mostrados nas curvas. O valor de p foi calculado pelo teste *logrank*.

Dados os resultados obtidos na curva de Kaplan-Meier da Figura 14., realizou-se uma curva com os genótipos portadores do alelo mutante ^{105}Val para comparação da sobrevivência global com os indivíduos de genótipo $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$. Esta comparação não apresenta igualmente valor estatisticamente significativo ($p=0,325$) (Figura 15.).

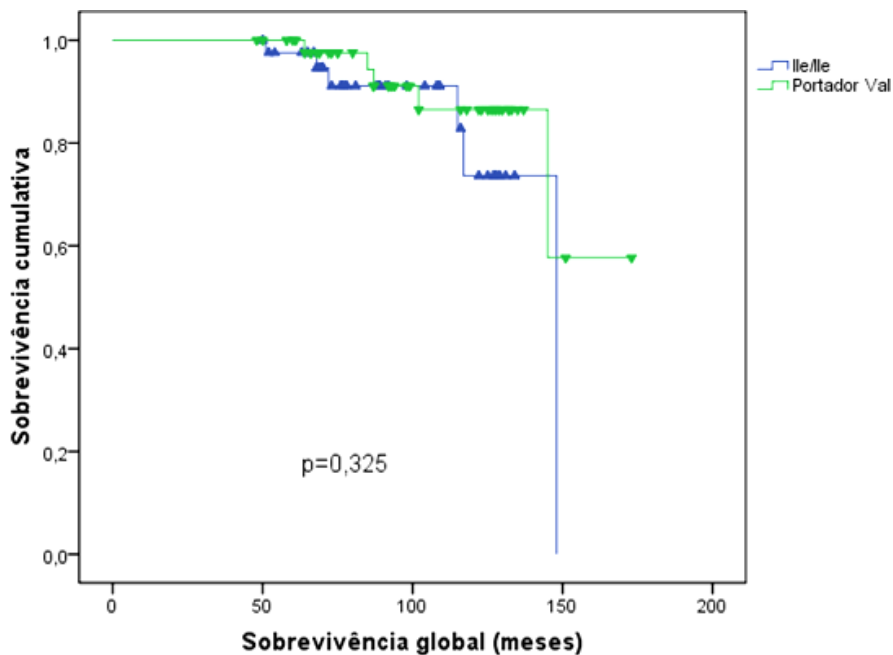


Figura 15. Curva de Kaplan-Meier dos genótipos agrupados ($^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$ versus $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$ e $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$) para sobrevivência global. Os casos censurados são mostrados nas curvas. O valor de p foi calculado pelo teste *log rank*.

RESULTADOS

Na análise feita aos 63 indivíduos dos estadios mais precoces, I e II, não se verificou associação estatisticamente significativa ($p=0,935$) entre a sobrevivência global e os genótipos do polimorfismo no gene GSTP1. Neste caso, os indivíduos com maior sobrevivência apresentam o genótipo $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$, comparativamente com os indivíduos portadores do genótipo $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$. Neste último genótipo, verificaram-se duas mortes num total de 25 indivíduos (Figura 16.).

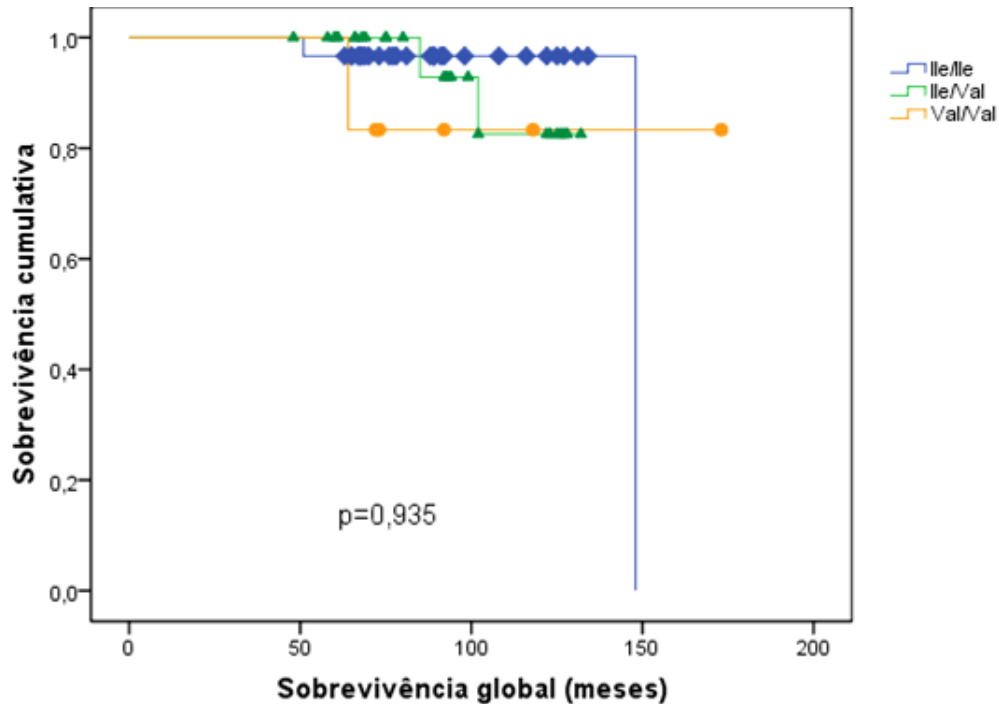


Figura 16. Curva de Kaplan Meier dos três genótipos do polimorfismo Ile105Val no gene GSTP1 ($^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$, $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$ e $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$) para sobrevivência global nos doentes de estadio I e II. Os casos censurados são mostrados nas curvas. O valor de p foi calculado pelo teste *log rank*.

Dos 25 indivíduos de estadios mais avançados, III e IV, e até ao final deste estudo, não se registou morte de nenhum portador do genótipo $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$. No entanto, registaram-se mais mortes dos indivíduos portadores do genótipo $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$. Contudo, esta relação, entre os três genótipos $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$, $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$ e $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$, e a sobrevivência global dos indivíduos, não foi estatisticamente significativa, com um valor de $p=0,132$ (Figura 17.).

RESULTADOS

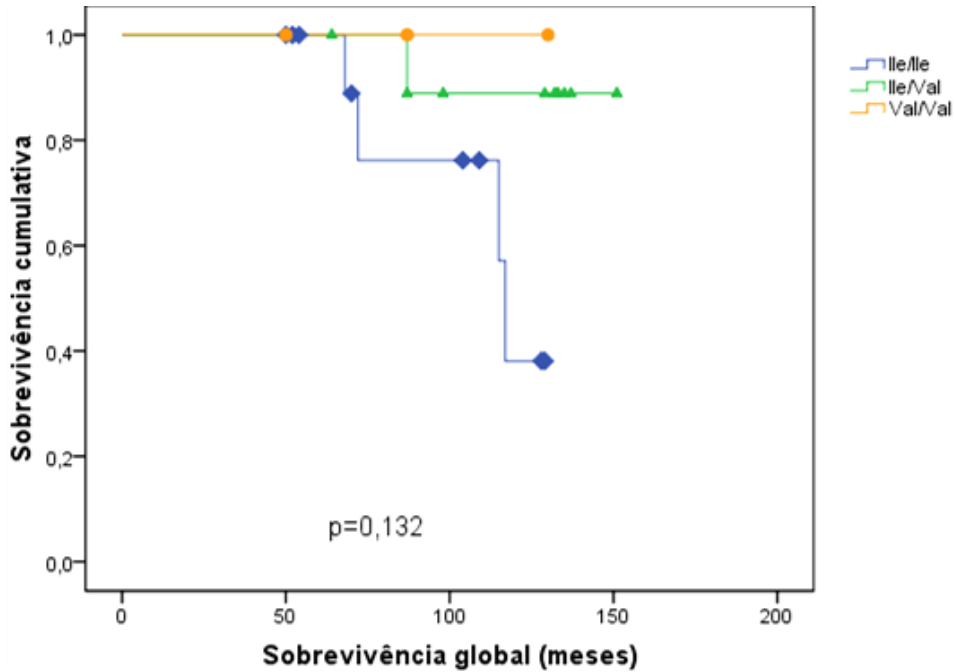


Figura 17. Curva de Kaplan Meier dos três genótipos do polimorfismo Ile105Val no gene GSTP1 ($^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$, $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$ e $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$) para sobrevivência global nos doentes de estadio III e IV. Os casos censurados são mostrados nas curvas. O valor de p foi calculado pelo teste *log rank*.

Na Figura 18., verifica-se que faleceram mais indivíduos de genótipo $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$ do que indivíduos portadores do alelo ^{105}Val e que em média, os doentes de estadios I e II portadores do alelo ^{105}Val vivem mais 13 meses do que os doentes de genótipos $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$.

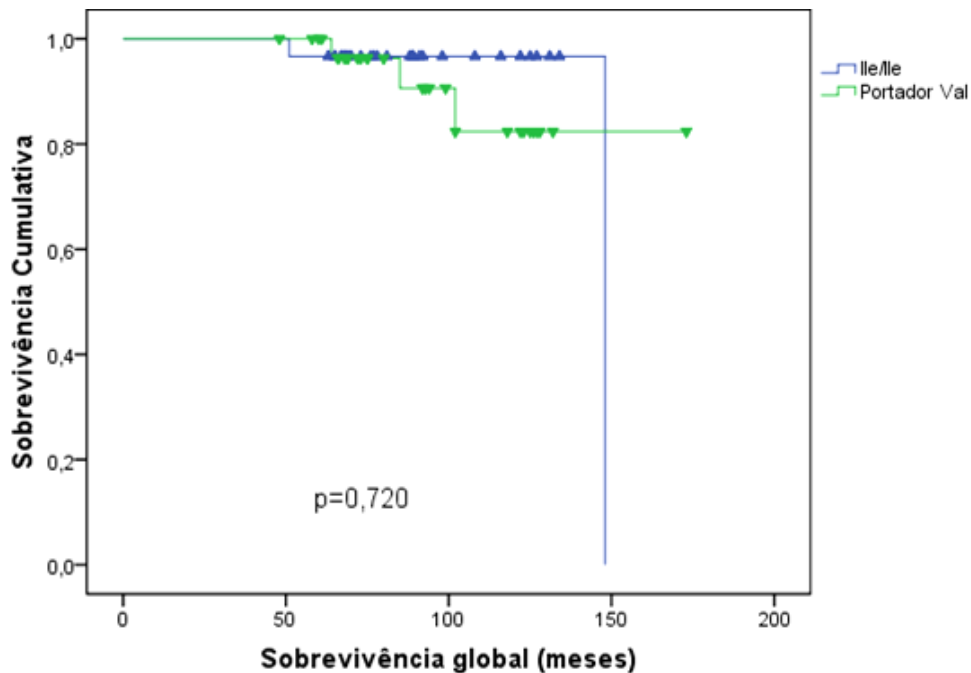


Figura 18. Curva de Kaplan Meier dos genótipos do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, agrupados ($^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$ versus $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$ e $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$) para sobrevivência global nos doentes de estadio I e II. Os casos censurados são mostrados nas curvas. O valor de p foi calculado pelo teste *log rank*.

RESULTADOS

Para a análise semelhante à efectuada na Figura 18., mas para indivíduos dos estadios III e IV, obteve-se um resultado estatisticamente significativo com valor de $p=0,046$. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que os indivíduos dos estadios III e IV, portadores do alelo polimórfico ^{105}Val têm uma taxa de sobrevivência global maior do que os indivíduos homocigóticos $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$. Em média, nos estadios mais avançados, os doentes portadores do alelo ^{105}Val vivem mais 35 meses que os doentes com o genótipo $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$ (Figura 19.).

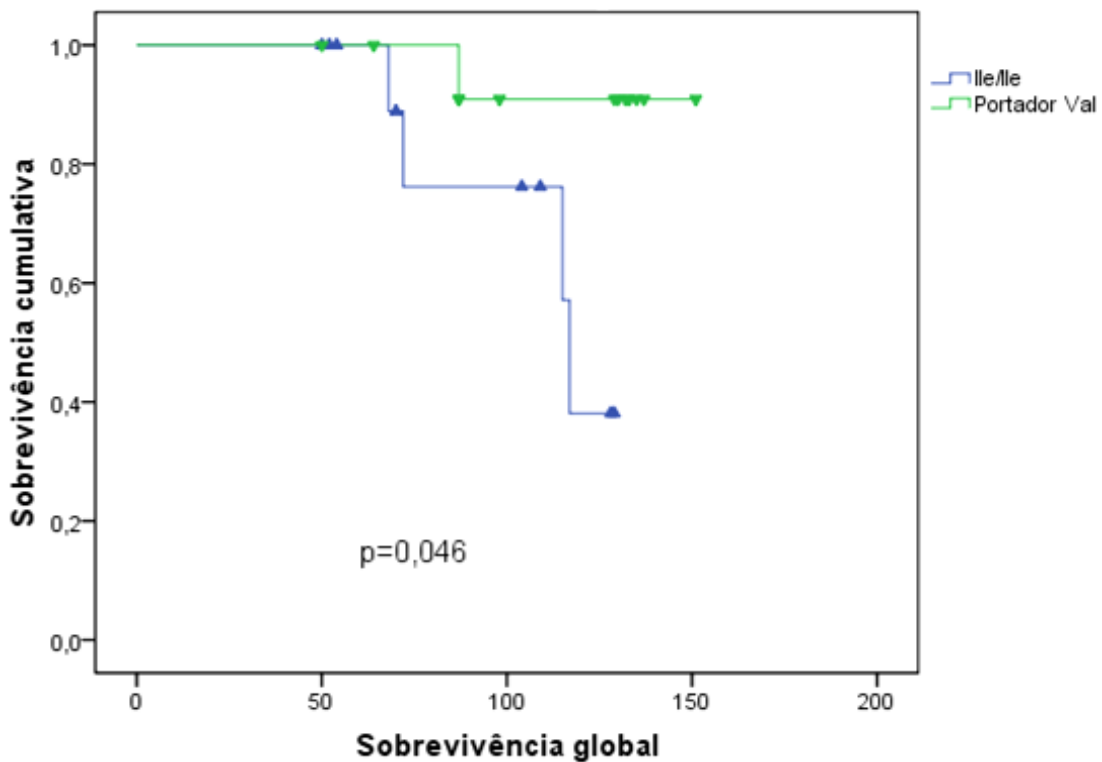


Figura 19. Curva de Kaplan Meier dos genótipos do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, agrupados ($^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Ile}$ versus $^{105}\text{Ile}/^{105}\text{Val}$ e $^{105}\text{Val}/^{105}\text{Val}$) para sobrevivência global nos doentes de estadio III e IV. Os casos censurados são mostrados nas curvas. O valor de p foi calculado pelo teste *log rank*.



5. Discussão

Na grande maioria das GSTs humanas existem polimorfismos genéticos, principalmente, polimorfismos de um único nucleótido. A relação entre esses polimorfismos e a resposta clínica à terapia do cancro é, actualmente, uma das principais áreas em foco na investigação, com o interesse particular nas GSTs das classes alfa, mu, pi e teta [76].

Em 2007, Spurdle *et al.* publicou um estudo, australiano, acerca do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, que relacionava o mesmo com o risco para cancro da mama. As distribuições genótípicas obtidas para uma população de 1232 casos de carcinoma da mama, de origem europeia, foram: 539 (43,8%) indivíduos de genótipo ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile, 545 (44,2%) de genótipo ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val e 148 (12,0%) de genótipo ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val [96].

Um estudo europeu, de Mitrunen *et al.* 2001, que incluiu 483 casos de carcinoma da mama, mostrou uma distribuição de genótipos de 58,6%, 36,9% e 4,6% para os genótipos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile, ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val e ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val respectivamente [97].

As frequências obtidas e exibidas, tanto na Tabela 10., como na Tabela 15., vão de encontro com os resultados dos estudos realizados anteriormente.

Segundo um estudo realizado por Sweeney *et al.*, entre 245 indivíduos, 35% apresentavam o genótipo GSTA1*A/*A, 49% GSTA1*A/*B e 16% GSTA1*B/*B. Ainda nesse estudo, não se verificaram diferenças na distribuição genotípica de acordo com a raça, idade ou estadio [80].

Em 2006, Ahn *et al.* verificaram uma distribuição de 33%, 48% e 19% para os genótipos GSTA1*A/*A, GSTA1*A/*B e GSTA1*B/*B, respectivamente, em 1036 indivíduos diagnosticados com cancro da mama e 35%, 48% e 17% em 1089 indivíduos saudáveis [98].

Também as frequências obtidas neste trabalho para os genótipos do polimorfismo no gene GSTA1, vão de encontro ao descrito na bibliografia (Tabela 12.).

A diferença do número de casos genotipados, nos doentes tratados com radioterapia, deve-se ao facto da utilização de técnicas com sensibilidades distintas para genotipagem. A técnica de *Real-Time* PCR é mais sensível do que a técnica de PCR-RFLP, pelo que foi possível determinara mais genótipos no caso do polimorfismo do gene GSTP1.

Quanto aos resultados obtidos para a resposta à radioterapia, não se verificou nenhum resultado de associação entre os polimorfismos, nos genes GSTA1 e GSTP1, e as reacções agudas dos doentes.

Verificou-se uma tendência dos indivíduos portadores do alelo ¹⁰⁵Val do polimorfismo Ile105Val, do gene GSTP1, para desenvolverem reacções agudas e dos indivíduos homozigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile, para terem menos reacções. As variações na actividade catalítica das GSTP1 são uma explicação possível para este resultados. Como foi já descrito, o alelo ¹⁰⁵Val resulta numa proteína com menor actividade [83,86], logo, é possível que as espécies reactivas criadas durante o tratamento sejam mais dificilmente eliminadas, provocando um efeito tóxico visível, uma vez que atacam tanto as células tumorais como as células de tecidos normais. Por outro lado, se os indivíduos homozigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile, produzem duas proteínas normalmente activas, que eliminam de forma mais eficiente as toxinas produzidas durante a radioterapia, então, estes têm menos reacções agudas na pele.

Um estudo de Ambrosone *et al.*, de 2006, demonstrou que doentes de genótipo GSTP1 codificante de proteínas com menor actividade tinham uma maior probabilidade de virem a desenvolver toxicidade associada à radioterapia do cancro da mama [99]. Embora as toxicidades medidas no estudo mencionado e no presente trabalho sejam distintas, os resultados estão em concordância.

Foi mais evidente, na análise do polimorfismo GSTA1, como os resultados deste estudo podem ser ilusórios. Observou-se que os indivíduos portadores do alelo GSTA1*A, tanto têm propensão para desenvolverem reacções agudas da pele, como não. Este efeito contraditório não é biologicamente plausível. As amostras utilizadas, foram claramente pequenas e pouco representativas.

No grupo de doentes tratados com radioterapia, de fototipo III e IV, encontrou-se uma diferença, apesar de não ser estatisticamente significativa, no registo de reacções agudas relativamente aos doentes de fototipo I e II: Os doentes classificados com os fototipo III e IV tiveram mais reacções agudas do que os de fototipo I e II.

Num estudo recente, de Yamazaki *et al.* de 2011, que associou os fototipos com a pigmentação da pele resultante da resposta à radioterapia em mulheres submetidas anteriormente a cirurgia conservadora da mama, foi demonstrado que os doentes de pele mais escura desenvolviam uma maior pigmentação e dermatite associadas ao tratamento de radioterapia. A classificação por fototipos é controversa e bastante subjectiva, podendo não apresentar qualquer factor de risco [100].

Há uma necessidade de um registo rigoroso e prospectivo da toxicidade significativa da pele, para reunir dados comparativos sobre os quais se possam delinear recomendações base para a prática do tratamento de reacções agudas que surgem durante o tratamento de radioterapia [101].

Só foi possível avaliar as reacções agudas da pele, como resposta ao tratamento dos doentes tratados com radioterapia, dado o espaço curto de tempo de observação do estudo.

No caso do estudo da influência do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, na resposta à terapia das mulheres submetidas a hormonoterapia, a informação reunida de resposta à terapia foi o conjunto de dados de sobrevivência global dos doentes.

Verificou-se que no geral, os indivíduos de genótipo ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val vivem em média mais meses do que indivíduos portadores de outros genótipos do polimorfismo no gene GSTP1. Contudo, os resultados estatisticamente significativos, foram apenas os obtidos para a relação entre a sobrevivência dos indivíduos de estadios III e IV e os genótipos agrupados, homocigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile e portadores do alelo ¹⁰⁵Val. Os indivíduos portadores do alelo ¹⁰⁵Val possuem uma melhor resposta à terapia, traduzida numa maior sobrevivência global, em comparação com os indivíduos homocigóticos ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile.

Os resultados de um estudo de 2010 de Li *et al.*, que realizou a análise do polimorfismo Ile105Val, no gene GSTP1, em doentes com carcinoma gástrico em fase avançada tratados com quimioterapia revelaram que doentes portadores de pelo menos um alelo ¹⁰⁵Val possuíam uma taxa de resposta mais controlada à terapia quando comparados com doentes homocigóticos, de genótipo ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile. No estudo referido, os autores demonstraram que doentes com dois alelos ¹⁰⁵Ile tinham um maior risco, estatisticamente significativo, de progressão da doença e morte [102].

Tanto as conclusões do estudo, como os resultados obtidos neste trabalho, suportam a hipótese de que a sensibilidade aos agentes anti-neoplásicos pode verificar-se pelo mau emparelhamento da proteína mutante do alelo ¹⁰⁵Val, do gene GSTP1. Isto é, os efeitos das drogas utilizadas para o tratamento do cancro podem ser diferentes quando as enzimas responsáveis pela eliminação dessas mesmas drogas do organismo, demonstram uma actividade reduzida. Ao serem menos eficazmente eliminadas, o tempo de semi-vida dos agentes anti-neoplásicos é maior e portanto o tempo de actuação é também maior, resultando num maior combate à doença.

A análise realizada entre o polimorfismo Ile105Val e a resposta à terapia do cancro da mama, em mulheres tratadas com hormonoterapia, possui muitas variáveis que podem estar a entrar em conflito e a falsear os resultados. Em primeiro lugar, não estão definidos ao pormenor os esquemas de tratamento efectuados pelas doentes, ou seja, comparam-se indivíduos que foram submetidos a condições diferentes de tratamento. Em segundo lugar, como a amostra inclui poucos indivíduos, foi necessário agrupar os mesmos, sendo a análise resultante pouco específica.

Assim, o estudo iniciado para esta dissertação deverá ter continuidade com amostras maiores, melhor definidas, com mais variáveis para explorar e para validar os resultados preliminares deste estudo.

A rectangular banner with a dark background featuring a microscopic image of several cells, likely yeast or bacteria, showing internal structures and some reddish-brown spots. The text is overlaid on this image.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

6. Conclusão e Perspectivas futuras

Falhas nos mecanismos de desintoxicação estão frequentemente associados a um maior risco para o aparecimento de uma neoplasia. Por outro lado, a sobreexpressão das enzimas GSTs e níveis elevados de GSH nas células estão relacionados com uma maior resistência a terapias anti-tumorais.

Neste trabalho verificou-se, embora estatisticamente insignificante, uma tendência para portadores do alelo variante ¹⁰⁵Val, do polimorfismo Ile¹⁰⁵Val, no gene GSTP1, apresentaram um maior registo de reacções agudas da pele em resposta à radioterapia. Relativamente a indivíduos portadores do alelo GSTA1*A, no gene GSTA1, estes sofreram maior toxicidade à radioterapia do que indivíduos homozigóticos para o alelo variante GSTA1*B.

Geralmente, não é possível encontrar uma correlação directa entre os efeitos agudos adversos e a severidade de efeitos a longo prazo [103]. É então necessário realizar a avaliação da resposta à radioterapia segundo outros critérios, para além dos da escala de RTOG *Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria*.

Verificou-se uma associação estatisticamente significativa, entre indivíduos de estadios avançados com os genótipos ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val e ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Val e uma maior sobrevivência global, quando submetidos a hormonoterapia conjugada com outra terapia.

O estudo efectuado da influência dos polimorfismos nos genes das glutathione S-transferase na resposta à terapia do cancro da mama apresenta várias limitações. Contudo, os resultados permitem verificar que de facto pode existir um papel importante dos polimorfismos das GSTs na determinação da resposta à terapia do cancro da mama.

No geral, os objectivos propostos para esta dissertação foram alcançados. Será, no entanto, necessário aumentar o número de casos analisados e uma melhor estratificação das variáveis para obter um maior poder estatístico e uma maior representatividade da amostragem.

A compreensão da influência das variantes alélicas nos polimorfismos das enzimas Glutathione S-Transferases poderá contribuir para um melhor esclarecimento das diferenças inter-individuais de respostas à terapia. Actualmente, estão em estudo possíveis abordagens farmacológicas e genéticas para o controlo da actividade das GSTs [104].

A continuação deste projecto poderá revelar se é necessário ter em conta os polimorfismos das Glutathione S-Transferase, para uma melhor e individual escolha do tratamento adequado para o cancro da mama.

7. Bibliografia

1. Ponder BA (2001) Cancer genetics. *Nature* 411: 336-341.
2. Hiatt RA, Rimer BK (1999) A new strategy for cancer control research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 957-964.
3. Aebersold R, Anderson L, Caprioli R, Druker B, Hartwell L, et al. (2005) Perspective: a program to improve protein biomarker discovery for cancer. *J Proteome Res* 4: 1104-1109.
4. Hartwell L (2005) How to Build a Cancer Sensor System. *The Scientist* 19: 18-19.
5. Issaq HJ, Waybright TJ, Veenstra TD (2011) Cancer biomarker discovery: Opportunities and pitfalls in analytical methods. *Electrophoresis* 32: 967-975.
6. Dunn BK, Wagner PD, Anderson D, Greenwald P (2010) Molecular markers for early detection. *Semin Oncol* 37: 224-242.
7. Ioannidis JP (2003) Genetic associations: false or true? *Trends Mol Med* 9: 135-138.
8. Song M, Lee KM, Kang D (2011) Breast cancer prevention based on gene-environment interaction. *Mol Carcinog* 50: 280-290.
9. Ferlay J, Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2008) *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. GLOBOCAN No. 10* [Internet].
10. Dhakal S (2010) Oncoprevention in gynecology. *JNMA J Nepal Med Assoc* 49: 167-173.
11. Adami HO, Signorello LB, Trichopoulos D (1998) Towards an understanding of breast cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 8: 255-262.
12. Kalager M, Zelen M, Langmark F, Adami HO (2010) Effect of screening mammography on breast-cancer mortality in Norway. *N Engl J Med* 363: 1203-1210.
13. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG (1983) 'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature* 303: 767-770.
14. Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, et al. (1995) A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 87: 190-197.
15. Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathak DR, Slomski CA, et al. (1999) Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4559-4565.
16. Hulka BS, Stark AT (1995) Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 346: 883-887.
17. Sellers TA, Kushi LH, Potter JD, Kaye SA, Nelson CL, et al. (1992) Effect of family history, body-fat distribution, and reproductive factors on the risk of postmenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 326: 1323-1329.
18. Jardines L, G. Haffty, B., Fisher, P., Weitzel, J., Royce, M. (2005) Breasts cancer overview. In: Pazdur R, R. Coia, L., J. Hoskins, W., D. Wagman, L., editor. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 9 ed: Cmp United Business Media. pp. 175-183.
19. Lu S, Wang Z, Cui D, Liu H, Hao X (2011) Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 34,658 subjects. *Breast Cancer Res Treat* 125: 253-259.
20. Safe SH (1998) Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 121-158.
21. Seeley RR, Seeley RRA, physiology (2011) *Seeley's anatomy & physiology*. New York: McGraw-Hill. p. 1052

-
22. Greene FL (2002) AJCC cancer staging manual. New York ; London: Springer. p.233
 23. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, et al. (2002) Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 3628-3636.
 24. Kumar V, Robbins SL (2007) Robbins basic pathology. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier. p.173-217
 25. Jardines L, G. Haffty, B., Fisher, P., Weitzel, J., Royce, M. (2005) Stages 0 and I breast cancer. In: Pazdur R, R. Coia, L., J. Hoskins, W., D. Wagman, L., editor. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach: Cmp United Business Media.* pp. 203-218.
 26. Jardines L, G. Haffty, B., Fisher, P., Weitzel, J., Royce, M. (2005) Stage II breast cancer. In: Pazdur R, R. Coia, L., J. Hoskins, W., D. Wagman, L., editor. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 9 ed: Cmp United Business Media.* pp. 219-232.
 27. Jardines L, G. Haffty, B., Fisher, P., Weitzel, J., Royce, M. (2005) Stages III and IV breast cancer. In: Pazdur R, R. Coia, L., J. Hoskins, W., D. Wagman, L., editor. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 9 ed: Cmp United Business Media.* pp. 235-254.
 28. Tubiana-Hulin M, Becette V, Bieche I, Mauriac L, Romieu G, et al. (2007) Exemestane as neoadjuvant hormone therapy for locally advanced breast cancer: results of a phase II trial. *Anticancer Res* 27: 2689-2696.
 29. D. Wagman L (2005) Principles of Surgical Oncology. In: R. Pazdur RC, L., J. Hoskins, W., D. Wagman, L., editor. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach: Cmp United Business Media.* pp. 1-9.
 30. Dixon JM (2008) Reducing early recurrence with adjuvant aromatase inhibitors: what is the evidence? *Breast* 17: 353-360.
 31. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS (2010) Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 81: 1339-1346.
 32. World Health O (1979) Who handbook for reporting results of cancer treatment. [S.l.]: WHO.
 33. Bland CS (1981) The Halsted mastectomy: present illness and past history. *West J Med* 134: 549-555.
 34. Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R, Mauldin PD, Palesch Y, et al. (2004) Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg* 239: 828-837; discussion 837-840.
 35. Hammer C, Fanning A, Crowe J (2008) Overview of breast cancer staging and surgical treatment options. *Cleve Clin J Med* 75 Suppl 1: S10-16.
 36. Joensuu H (2008) Systemic chemotherapy for cancer: from weapon to treatment. *Lancet Oncol* 9: 304.
 37. Tan SH, Lee SC, Goh BC, Wong J (2008) Pharmacogenetics in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14: 8027-8041.
 38. Takimoto CH, Calvo, E. (2005) Principles of oncologic pharmacotherapy. In: R. Pazdur RC, L., J. Hoskins, W., D. Wagman, L., editor. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach: Cmp United Business Media.* pp. 28.
 39. Yager JD (2000) Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 67-73.
 40. Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354: 270-282.
 41. Russo IH, Russo J (1996) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104: 938-967.
 42. Recht A (2010) Radiotherapy, antihormonal therapy, and personalised medicine. *Lancet Oncol* 11: 215-216.

-
43. Rivera-Guevara C, Camacho J (2011) Tamoxifen and its new derivatives in cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6: 237-245.
 44. Miller WR (1996) Steroid hormones and cancer: (I) basic biology and endocrinology. *Eur J Surg Oncol* 22: 627-633.
 45. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, et al. (2001) Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 19: 3808-3816.
 46. Dixon JM (2002) Exemestane: a potent irreversible aromatase inactivator and a promising advance in breast cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2: 267-275.
 47. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, et al. (1991) Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21: 109-122.
 48. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, et al. (2001) Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med* 345: 1378-1387.
 49. Gazda MJ, Coia, L. R. (2005) Principles of radiation therapy. In: Pazdur R, Coia, L., Hoskins, W., Wagman, L., editor. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 9 ed: Cmp United Business Media. pp. 11-21.
 50. Sun J, Chen Y, Li M, Ge Z (1998) Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radic Biol Med* 24: 586-593.
 51. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91 Spec No: 179-194.
 52. Ellis F (1969) Dose, time and fractionation: a clinical hypothesis. *Clin Radiol* 20: 1-7.
 53. Edvardsen H, Kristensen VN, Grenaker Alnaes GI, Bohn M, Erikstein B, et al. (2007) Germline glutathione S-transferase variants in breast cancer: relation to diagnosis and cutaneous long-term adverse effects after two fractionation patterns of radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67: 1163-1171.
 54. Spanos WJ, Jr., Montague ED, Fletcher GH (1980) Late complications of radiation only for advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6: 1473-1476.
 55. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.
 56. Markovic J, Garcia-Gimenez JL, Gimeno A, Vina J, Pallardo FV (2010) Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radic Res* 44: 721-733.
 57. Balendiran GK, Dabur R, Fraser D (2004) The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct* 22: 343-352.
 58. Dickinson DA, Forman HJ (2002) Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 973: 488-504.
 59. Maher P (2005) The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev* 4: 288-314.
 60. Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, et al. (1994) Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 8: 1131-1138.
 61. Chiu CP, Harley CB (1997) Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 99-106.
 62. Borrás C, Esteve JM, Vina JR, Sastre J, Vina J, et al. (2004) Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 34332-34335.
 63. Hayflick L (2000) The illusion of cell immortality. *Br J Cancer* 83: 841-846.
 64. Hiyama E, Tatsumoto N, Kodama T, Hiyama K, Shay J, et al. (1996) Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 9: 453-458.
 65. Mokbel K (2000) The role of telomerase in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 26: 509-514.

-
66. Meisenberg G, H. Simmons, W. (2006) Lipophilic Xenobiotics Are Metabolized to Water-Soluble Products. In: Elsevier M, editor. Principles of Medical Biochemistry. Philadelphia: p. 569.
 67. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 154: 103-116.
 68. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J 360: 1-16.
 69. Norppa H (2003) Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. Mutat Res 544: 339-348.
 70. Josephy PD (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. Hum Genomics Proteomics 2010: 876940.
 71. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 51-88.
 72. Meyer UA (1991) Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. Pharmacogenetics 1: 66-67.
 73. Regateiro FJ, editor (2007) Manual de Genética Médica. 1ª Edição ed. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra. p.44
 74. Hayes JD, Strange RC (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. Pharmacology 61: 154-166.
 75. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. Biomed Pharmacother 57: 145-155.
 76. Lo HW, Ali-Osman F (2007) Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. Curr Opin Pharmacol 7: 367-374.
 77. Parl FF (2005) Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. Cancer Lett 221: 123-129.
 78. Coles B, Nowell SA, MacLeod SL, Sweeney C, Lang NP, et al. (2001) The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. Mutat Res 482: 3-10.
 79. Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A (2002) The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. Pharmacogenetics 12: 277-286.
 80. Sweeney C, Ambrosone CB, Joseph L, Stone A, Hutchins LF, et al. (2003) Association between a glutathione S-transferase A1 promoter polymorphism and survival after breast cancer treatment. Int J Cancer 103: 810-814.
 81. Islam MQ, Platz A, Szpirer J, Szpirer C, Levan G, et al. (1989) Chromosomal localization of human glutathione transferase genes of classes alpha, mu and pi. Hum Genet 82: 338-342.
 82. Board PG, Webb GC, Coggan M (1989) Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. Ann Hum Genet 53: 205-213.
 83. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J (1997) Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. J Biol Chem 272: 10004-10012.
 84. Lo HW, Ali-Osman F (1997) Genomic cloning of hGSTP1*C, an allelic human Pi class glutathione S-transferase gene variant and functional characterization of its retinoic acid response elements. J Biol Chem 272: 32743-32749.

-
85. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19: 275-280.
 86. Hu X, Xia H, Srivastava SK, Pal A, Awasthi YC, et al. (1998) Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenanthrene and benzo[g]chrysene. *Cancer Res* 58: 5340-5343.
 87. An JH, Kim J, Seong J (2004) Redox signaling by ionizing radiation in mouse liver. *Ann N Y Acad Sci* 1030: 86-94.
 88. Silvestrini R, Veneroni S, Benini E, Daidone MG, Luisi A, et al. (1997) Expression of p53, glutathione S-transferase-pi, and Bcl-2 proteins and benefit from adjuvant radiotherapy in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 89: 639-645.
 89. Raza H, Awasthi YC, Zaim MT, Eckert RL, Mukhtar H (1991) Glutathione S-transferases in human and rodent skin: multiple forms and species-specific expression. *J Invest Dermatol* 96: 463-467.
 90. Terrier P, Townsend AJ, Coindre JM, Triche TJ, Cowan KH (1990) An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am J Pathol* 137: 845-853.
 91. Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, et al. (1998) Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5275-5280.
 92. Jhaveri MS, Morrow CS (1998) Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene* 210: 1-7.
 93. Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, et al. (2001) Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics* 11: 663-669.
 94. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, et al. (1997) Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 25: 2657-2660.
 95. Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB (1997) Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res* 25: 3718-3723.
 96. Spurdle AB, Chang JH, Byrnes GB, Chen X, Dite GS, et al. (2007) A systematic approach to analysing gene-gene interactions: polymorphisms at the microsomal epoxide hydrolase EPHX and glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1, and GSTP1 loci and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 769-774.
 97. Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, et al. (2001) Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 229-236.
 98. Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, et al. (2006) Effects of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) genotype and potential modifiers on breast cancer risk. *Carcinogenesis* 27: 1876-1882.
 99. Ambrosone CB, Tian C, Ahn J, Kropp S, Helmbold I, et al. (2006) Genetic predictors of acute toxicities related to radiation therapy following lumpectomy for breast cancer: a case-series study. *Breast Cancer Res* 8: R40.
 100. Yamazaki H, Yoshida K, Nishimura T, Kobayashi K, Tsubokura T, et al. (2011) Association between skin phototype and radiation dermatitis in patients with breast cancer treated with breast-conserving therapy: suntan reaction could be a good predictor for radiation pigmentation. *J Radiat Res (Tokyo)* 52: 496-501.
 101. Kumar S, Juresic E, Barton M, Shafiq J (2010) Management of skin toxicity during radiation therapy: a review of the evidence. *J Med Imaging Radiat Oncol* 54: 264-279.

-
102. Li QF, Yao RY, Liu KW, Lv HY, Jiang T, et al. (2010) Genetic polymorphism of GSTP1: prediction of clinical outcome to oxaliplatin/5-FU-based chemotherapy in advanced gastric cancer. *J Korean Med Sci* 25: 846-852.
 103. Dorr W, Hendry JH (2001) Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 61: 223-231.
 104. Ruscoe JE, Rosario LA, Wang T, Gate L, Arifoglu P, et al. (2001) Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTpi) influences cell proliferation pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 339-345.