



Instituto Português de Oncologia
Francisco Gentil
Centro Regional de Oncologia do Porto



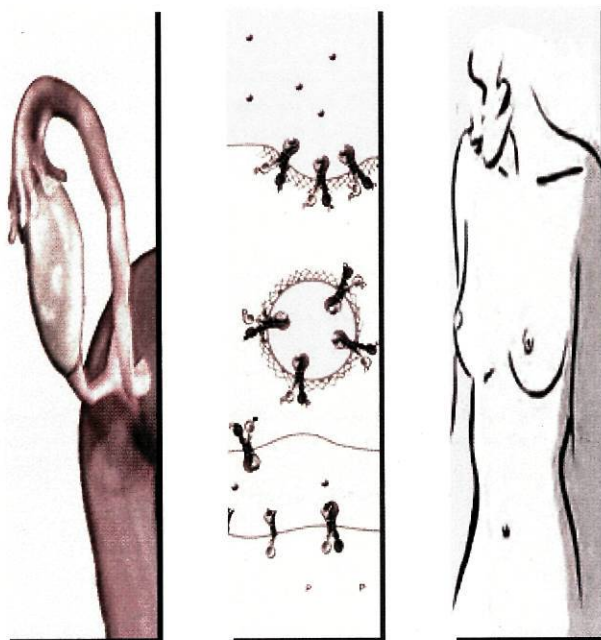
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto



Jefferson
Medical
College
Jefferson Medical College
Thomas Jefferson University - USA

CURSO DE MESTRADO EM ONCOLOGIA

POLIMORFISMO NO GENE *HER2* NO CANCRO DA MAMA E DO OVÁRIO



Dissertação de Mestrado da Licenciada

DANIELA AMARAL TAVARES PINTO

PORTO, 2003

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR

**Polimorfismo no gene HER2 no cancro
da mama e do ovário**

Orientador: Prof. Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Co-orientador: Prof. Doutor Carlos Alberto da Silva Lopes

DANIELA AMARAL TAVARES PINTO

Porto, 2003

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE
MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR DA
UNIVERSIDADE DO PORTO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Rui Medeiros, muito mais do que meu orientador, pela confiança que depositou em mim... Obrigada pelo apoio e estímulo constantes, com os insistentes "O artigo, já está pronto?", exemplo da sua perseverança e dedicação à investigação.

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes, co-orientador deste trabalho, pela disponibilização de todos os meios do Laboratório de Patologia Molecular, essenciais para a concretização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Guimarães dos Santos, pelo empenho que sempre dedicou ao Mestrado de Oncologia.

Ao Prof. Doutor João Amado, pela dedicação que tem demonstrado neste curso de Mestrado, e pelo aconselhamento nas partes críticas desta dissertação.

Ao Núcleo Regional Norte da Liga Portuguesa Contra o Cancro, nas pessoas do Dr. Cardoso da Silva e Dr. Vítor Veloso, por me concederem a bolsa que permitiu a realização deste projecto.

À Dra. Deolinda Pereira, Dra. Helena Rodrigues e Dra. Catarina Portela, pela ajuda fulcral na parte clínica deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Palmeira e à Dra. Sandra Costa, que de colegas de trabalho se tornaram verdadeiros amigos... Obrigada pelos almoços inesquecíveis!

Aos mestrandos e estagiários do Laboratório de Patologia Molecular, que continuamente se aplicam na investigação básica, apesar da falta de apoios, por aturarem o meu "mau-feitio".

Aos meus amigos, por tolerarem as minhas ausências. À Su e ao Rangel pela preocupação e carinho constantes.

Ao André, por fazer os possíveis e os impossíveis! Obrigada pelo teu apoio, que me ajuda a seguir em frente... e por me mostrares "como as estrelas brilham".

A toda a minha família, que me apoiou desde o primeiro momento. À minha mãe, pelo amor e paciência inesgotável.

Ao meu pai, que até ao fim da sua vida acreditou que eu conseguiria ir mais longe...

À Eva, pelo sorriso ao fim do dia, capaz de recarregar baterias para mais um dia difícil.

ÍNDICE

Resumo	ix
Summary	xiii
Introdução	1
O Cancro.....	2
Os polimorfismos.....	5
O <i>HER2</i>	6
A família de receptores HER.....	7
Activação dos receptores HER.....	7
Rede de sinalização.....	9
Activação do oncogene <i>HER2</i>	11
Importância do <i>HER2</i> no carcinoma da mama.....	12
Importância do <i>HER2</i> em tumores ginecológicos.....	13
O cancro da mama.....	14
Factores de risco para cancro da mama.....	16
O cancro do ovário.....	17
Factores de risco para cancro do ovário.....	19
Objectivos	21
Material e Métodos	23
Indivíduos Controlo.....	24
Pacientes com Cancro da Mama.....	24
Pacientes com Cancro do Ovário.....	25
Processamento das amostras.....	27
Amplificação do DNA.....	28
Identificação do fragmento de DNA.....	28
Análise do Polimorfismo <i>HER2</i>	29
Identificação dos fragmentos obtidos por RFLP.....	29
Análise Estatística.....	29

Resultados	31
Amplificação do DNA.....	32
Análise do polimorfismo <i>HER2</i>	32
Frequências do polimorfismo <i>HER2</i> nos indivíduos controlo.....	33
Frequências alélicas e genotípicas.....	33
Comparação com outras populações.....	34
Pacientes com cancro da mama.....	36
Frequências genotípicas tendo em conta características clínico- patológicas.....	37
Pacientes com neoplasia do ovário.....	39
Frequências alélicas e genotípicas.....	39
Frequências alélicas e genotípicas nos tumores benignos.....	40
Frequências alélicas e genotípicas nos tumores malignos.....	42
Frequências genotípicas tendo em conta características clínico- patológicas.....	43
Discussão	45
Conclusões e Perspectivas Futuras	51
Referências Bibliográficas	55
Anexos	71
Anexo I – soluções.....	72
Anexo II - " <i>HER2</i> polymorphism and breast cancer risk in a southern European population".....	73



RESUMO

O cancro é uma doença do genoma, que se encontra sistematicamente alterado em diversos locais nas células cancerígenas. No entanto, essas alterações não ocorrem do mesmo modo em todas as neoplasias, e mesmo para uma determinada neoplasia, as causas de aparecimento variam de indivíduo para indivíduo.

Pensa-se que algumas variantes genéticas, definidas como alelos de susceptibilidade de baixa penetrância, conferem um risco alterado para desenvolver cancro. Torna-se então importante compreender estas variantes genéticas, existentes nos vários tipos de tumor, de modo a definir grupos de indivíduos que sejam mais susceptíveis a uma determinada neoplasia.

O *HER2* é um proto-oncogene localizado no cromossoma 17, que tem um papel activo no controlo do crescimento e desenvolvimento celular. Alterações neste gene podem activá-lo, promovendo a sua função oncogénica.

Foi descrito um polimorfismo no codão 655 do gene *HER2*, que consiste numa transição G → A, resultando na alteração do aminoácido valina para isoleucina.

Os objectivos deste trabalho foram a análise da frequência deste polimorfismo num grupo de indivíduos sem qualquer patologia, bem como em mulheres com carcinoma da mama e mulheres com neoplasia do ovário; e verificar a existência de associações entre a frequência do polimorfismo estudado e a susceptibilidade para carcinoma da mama e ovário.

Foram analisadas amostras de DNA correspondentes a cento e quarenta e seis (146) mulheres sem qualquer patologia oncológica, cento e cinquenta e duas (152) mulheres com carcinoma da mama e cento e trinta (130) mulheres com neoplasia do ovário, das quais 23 apresentavam tumores benignos e 107 apresentavam tumores malignos. Utilizou-se a técnica PCR-RFLP para obtenção dos genótipos *HER2*.

Foi encontrado um risco de cancro da mama duas vezes superior nas mulheres portadoras de pelo menos um alelo Val – genótipos Ile/Val e Val/Val (OR = 2.00; 95% CI 1.23 – 3.25; p = 0.005). Para o grupo de mulheres com neoplasia do ovário, não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa (p=0.119). No entanto, no subgrupo de tumores benignos do ovário existe um risco 2.55 vezes superior nas mulheres que possuíam pelo menos um alelo Val – genótipos Ile/Val (OR = 2.55; 95% CI 1.03-6.16; p = 0.039). Os nossos resultados indicam uma associação entre a presença do alelo Val e o risco para desenvolvimento de cancro da mama. Estudos futuros serão necessários para a compreensão do papel deste polimorfismo na susceptibilidade para cancro do ovário.



SUMMARY

Cancer is a disease of the genome, which is altered in several places in cancer cells. However, these alterations don't occur in the same way in all neoplasias, and even for the same neoplasia the causes seem to differ from individual to individual.

Genetic variants, defined as low penetrance susceptibility alleles, are thought to confer an altered risk for the development of cancer. Therefore, it is important to understand these genetic variants in order to define subgroups of individuals who are more susceptible to a certain neoplasia.

HER2 is a proto-oncogene located at chromosome 17, which plays an important role in the control of cellular development. Alterations in this gene can activate it, therefore enhancing its oncogenic function.

A polymorphism in the codon 655 of *HER2* gene, consisting in the transition G → A was identified.

The main objectives of our study were to analyse the frequency of this polymorphism in a group of healthy individuals, women with breast cancer and women with ovarian cancer; and to investigate the possible existence of associations between the frequency of the polymorphism and the susceptibility of breast and ovarian cancers.

We analysed DNA samples from one hundred and forty six (146) healthy women, one hundred and fifty two (152) women with breast cancer and one hundred and thirty (130) women with ovarian neoplasia, twenty-three (23) of which had benign tumours and one hundred and seven (107) had malignant tumours. We used the PCR-RFLP method in order to obtain the *HER2* genotypes.

We found a two-fold increase in the risk of breast cancer in women carrying a Val allele genotype – genotypes Ile/Val or Val/Val (OR = 2.00; 95% CI 1.23 – 3.25; p = 0.005).

For the group of women with ovarian neoplasia, we didn't find a statistically significant association ($p=0.119$). However, in the subgroup of benign tumours, we found a 2.55 increase in the risk of neoplasia in women carrying a Val allele genotype (OR = 2.55; 95% CI 1.03-6.16; $p = 0.039$). Our results indicate an association between the presence of the Val allele in the *HER2* polymorphism and the risk of breast cancer. Further studies are needed to evaluate the role of this polymorphism in the development of ovarian cancer.



INTRODUÇÃO

O CANCRO

O Cancro é um problema crescente de saúde pública em todo o mundo, constituindo a segunda causa de morte em variados países, nomeadamente nos Estados Unidos da América (Kumar *et al.*, 2003) e em Portugal (Pinheiro *et al.*, 2002). Para além das elevadas taxas de mortalidade, este tipo de doença está intimamente associado a um sofrimento físico e emocional (Kumar *et al.*, 2003), e como tal, têm sido feitos numerosos estudos na tentativa de compreensão da doença. Neste sentido, o diagnóstico e o tratamento precoce, bem como a identificação de indivíduos sob risco aumentado de desenvolver cancro têm sido importantes objectivos da pesquisa médica (Bishop, 1987).

A carcinogénese, mecanismo de desenvolvimento de um tumor, é um processo *multistep*, cujos passos reflectem alterações genéticas responsáveis pela transformação progressiva de células normais em células neoplásicas altamente malignas, passando por etapas de malignidade intermédias (Baak *et al.*, 2003). O cancro é então, uma doença do genoma, que se encontra sistematicamente alterado em diversos locais nas células cancerígenas (Weber, 2002). De facto, na base da carcinogénese estão alterações genéticas não letais; alterações essas que podem ser herdadas ou adquiridas pela acção de agentes ambientais, tais como químicos, radiações ou vírus.

A progressão de uma célula normal até uma célula maligna é um processo que pode demorar cerca de cinco a vinte anos (Liotta e Liu, 2001), e envolve a acumulação de mutações em genes cruciais, como os proto-oncogenes, genes supressores tumorais, genes reguladores da apoptose e genes de reparação de DNA (figura 1).

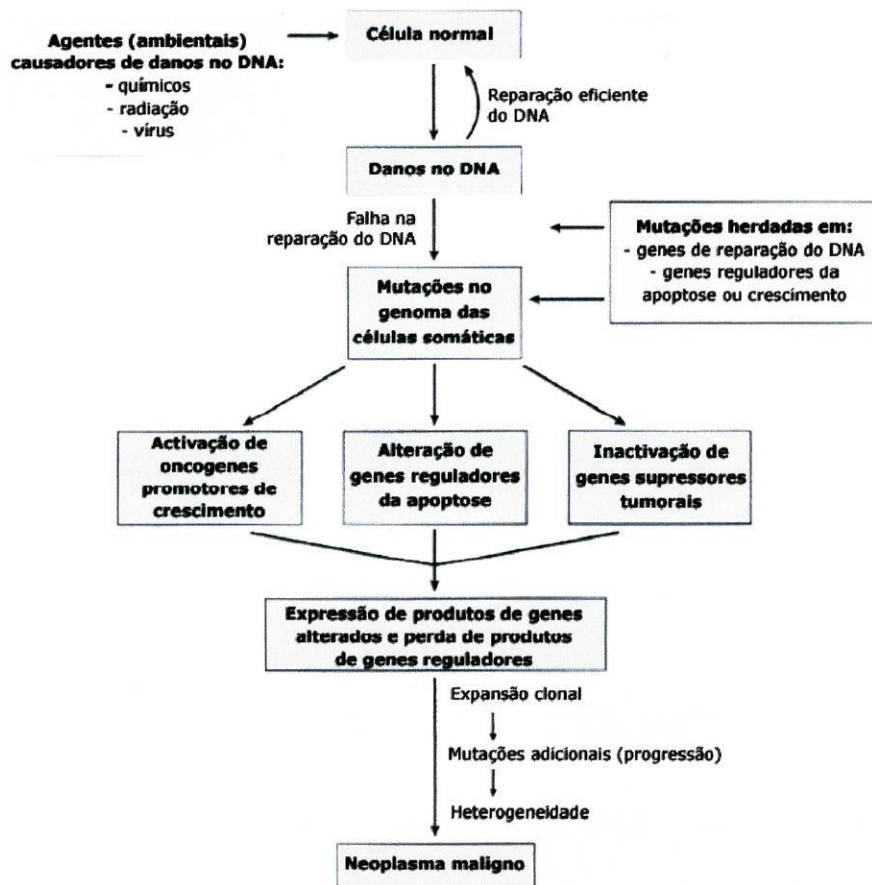


Figura 1 – Mecanismo exemplificativo da carcinogênese, demonstrando mutações em vários genes, em diversas etapas (adaptado de Kumar *et al.*, 2003).

Hanahan e Weinberg (2000) propuseram uma série de regras que governam esta transformação maligna. Segundo estes autores, existem seis alterações essenciais na fisiologia das células, que ditam o crescimento maligno (figura 2), e que serão comuns à maioria dos tumores. Essas alterações são: auto-suficiência em factores de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores do crescimento, fuga à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogénese e invasão tecidual e metastização. Os meios através dos quais estas capacidades são adquiridas variam, tanto no seu mecanismo como cronologicamente, e o número de mutações necessárias para adquirir uma determinada capacidade também é variável (Weber, 2002). Haverá

casos em que uma única mutação seja responsável por várias alterações fisiológicas, e casos em que são necessárias várias mutações em diversos genes importantes para adquirir apenas uma das capacidades. Isto explica a grande diversidade genética existente nos variados tipos de tumores.

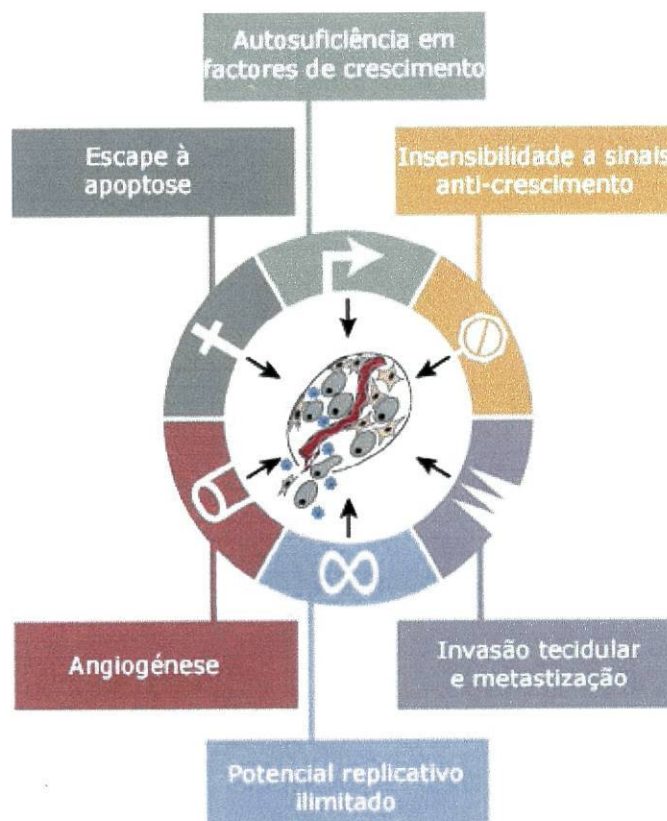


Figura 2 – Alterações essenciais para o desenvolvimento de um tumor (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000).

De facto, as causas de uma determinada neoplasia variam de indivíduo para indivíduo, mesmo que se trate da mesma neoplasia. Torna-se então importante compreender estas variantes genéticas, existentes nos vários tipos de tumor, de modo a definir grupos de indivíduos que sejam mais susceptíveis a uma determinada neoplasia.

Os POLIMORFISMOS

Polimorfismos são variações na sequência de DNA, que existem em indivíduos normais de uma população, estando a variante menos frequente presente em pelo menos 1% da população (Brookes, 1999).

Nos últimos anos tem havido um interesse renovado e extensivo em polimorfismos genéticos, 90% dos quais são *single nucleotide polymorphisms* (SNP), ou seja, polimorfismos em que a variação ocorre num único nucleotídeo. Têm sido efectuados vários estudos utilizando SNP para detectar associações entre um marcador/gene e uma determinada doença (Kruglyak, 1999), tendo particular impacto na avaliação de genes envolvidos na etiologia do cancro (Coughlin e Piper, 1999; Martin e Weber, 2000). Pensa-se que algumas destas variantes genéticas poderão ser definidas como alelos de susceptibilidade de baixa penetrância, conferindo um risco alterado para desenvolver cancro.

Crê-se que os riscos de determinadas doenças como o cancro são bastante influenciados pelos padrões de SNP que um indivíduo possui em determinados genes chave de susceptibilidade. Pensa-se que seja, provavelmente, o efeito combinado de um conjunto de SNP associados com factores ambientais, que determinam se um indivíduo irá desenvolver uma determinada doença (Brookes, 1999). Neste sentido, a construção e o uso de perfis de risco genéticos podem proporcionar melhorias significativas na eficácia de programas de intervenção de doenças como o cancro (Pharoah *et al.*, 2002).

O HER2

O *HER2* (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) é um proto-oncogene mapeado no cromossoma 17q21 (figura 3) (Coussens et al., 1985) que codifica uma glicoproteína transmembranar de 185 kDa (Akiyama et al., 1986; Bargmann et al., 1986a), designada p185^{HER2}, sendo muitas vezes referida na literatura como proteína ou receptor HER2.

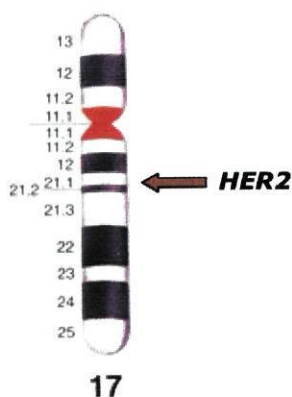


Figura 3 – Localização do gene *HER2* no cromossoma 17.

Este gene, também conhecido como *ERBB2*, tem um elevado grau de homologia com o gene *NEU*, que foi primeiramente identificado em ratos como sendo um proto-oncogene, activado por uma mutação induzida por etilnitrosureia em tumores neuroectodermis (Padhy et al., 1982). O gene *NEU* mutado leva à produção da forma activa do receptor, que tem a capacidade de transformar células normais em malignas (Bargmann et al., 1986b; Coussens et al., 1985).

O receptor HER2 é o segundo membro de uma família de receptores de factores de crescimento (HER) que está envolvida na regulação do crescimento e desenvolvimento das células normais, através da sua actividade tirosina cinase (Yarden, 2001; Hynes, 2000).

A FAMÍLIA DE RECEPTORES HER

A família HER é constituída por quatro receptores transmembranares homólogos, codificados por quatro genes denominados *EGFr* (*HER1/ ERBB1*), *HER2* (*NEU/ ERBB2*), *HER3* (*ERBB3*) e *HER4* (*ERBB4*) (Sherbet e Lakshmi, 1997). Os elementos desta família estão localizados na membrana celular e possuem uma estrutura comum entre si, que compreende um domínio extracelular de ligação a factores de crescimento, rico em cisteínas; um domínio transmembranar lipofílico e um domínio intracelular com actividade tirosina cinase (figura 4) (Van der Geer, 1994).

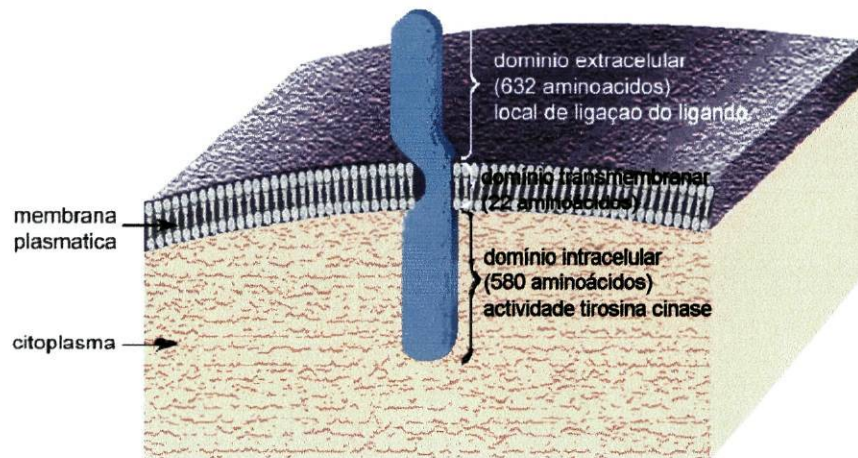


Figura 4 - Esquema de um receptor transmembranar HER (adaptado de Hoffman-La Roche, 1999).

ACTIVAÇÃO DOS RECEPTORES HER

Os receptores HER estão localizados na superfície das células sob a forma de monómeros (figura 4), e para serem activados dependem da ligação de pequenas moléculas (factores de crescimento ou ligandos). A ligação de um factor de crescimento a um receptor monomérico induz a sua dimerização

com outro receptor HER. A dimerização pode ocorrer entre o mesmo receptor (homodímero) ou entre outros membros da família HER (heterodímeros) (Alroy e Yarden, 1997), em dez combinações diferentes.

Diferentes ligandos aparentam induzir diferentes parceiros de dimerização ao longo da família HER, e estas variações parecem resultar em induções diferenciais de fosforilação de tirosinas pelo domínio intracelular.

Pelo menos seis ligandos, conhecidos como ligandos tipo EGF, activam o receptor HER1 (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1997). Estes ligandos incluem o EGF, $TGF\alpha$, anfirregulina, betacelulina e epirregulina. Em contraste com o receptor HER1, ainda não foi identificado nenhum ligando para o HER2. Apesar da homologia entre o HER2 e o receptor EGF, os ligandos tipo EGF ligam-se ao EGFR mas não ao HER2 (Stern, 2000). Uma segunda classe de ligandos para esta família de receptores, conhecidos como heregulinas ou neuregulinas, liga-se directamente ao HER3 e ao HER4, mas não ao HER1 ou ao HER2 (Tzahar *et al.*, 1994) (figura 5).

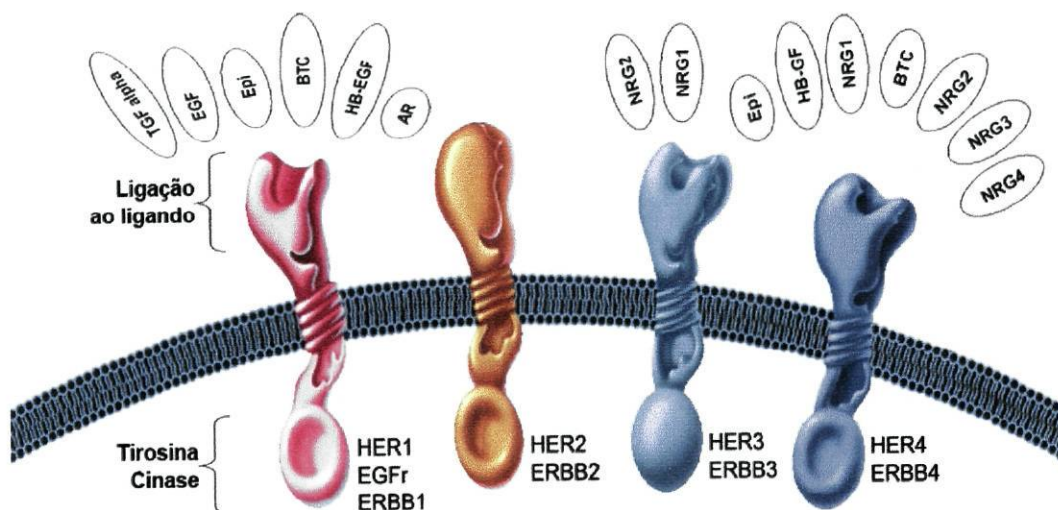


Figura 5 – Receptores da família HER e respectivos ligandos (adaptado de *Genentech slide kit*).

Apesar de o HER2 não possuir um ligando específico, ele aparenta ser o parceiro de heterodimerização preferencial dentro da família (Graus-Porta *et al.*, 1997; Sundaresan *et al.*, 1999). Este receptor é frequentemente transactivado pelos ligandos tipo EGF, resultando na formação de heterodímeros HER1/HER2. Do mesmo modo, as heregulinas podem induzir a formação de heterodímeros HER2/HER3 ou HER2/HER4. Esta dimerização entre o HER2 e os outros membros da família permite a sua participação no processo de transdução do sinal, mesmo na ausência de um ligando cognitivo (Yarden, 2001). De facto, heterodímeros que contêm o HER2 parecem possuir uma alta taxa de ligação aos ligandos, bem como uma potenciação de sinalização, quando comparadas com homodímeros ou heterodímeros que não contenham o HER2 (Sliwkowski *et al.*, 1994). Entre os membros da família HER, o HER2 parece desempenhar um papel fulcral no controlo da actividade dos outros três receptores.

REDE DE SINALIZAÇÃO

A transdução do sinal, mediada pelo receptor HER2, é um processo interactivo, que inclui diferentes ligandos, diferentes parceiros de dimerização e diferentes vias sub celulares de transdução do sinal. Este processo é conhecido como "rede de sinalização" (Yarden e Sliwkowski, 2001), e está envolvido no controlo do comportamento celular, incluindo o crescimento celular, a diferenciação celular, a apoptose, a migração e a adesão celulares (Hayes, 2000).

De um modo resumido, a junção de um ligando ao complexo heterodimérico de receptores leva à activação da actividade intrínseca de tirosina cinase, ocorrendo autofosforilação das tirosinas. Isto despoleta uma cascata de eventos que resulta na transmissão de sinais através da membrana celular e através do espaço intracelular para o núcleo, onde, posteriormente, ocorre a activação génica que leva à estimulação mitogénica (figura 6) (Alroy e Yarden, 1997; Scott *et al.*, 1991). Sendo assim, o receptor HER2 desempenha um papel importante na via de transdução do sinal indutor de crescimento e é crucial no controlo do crescimento e divisão de células normais.

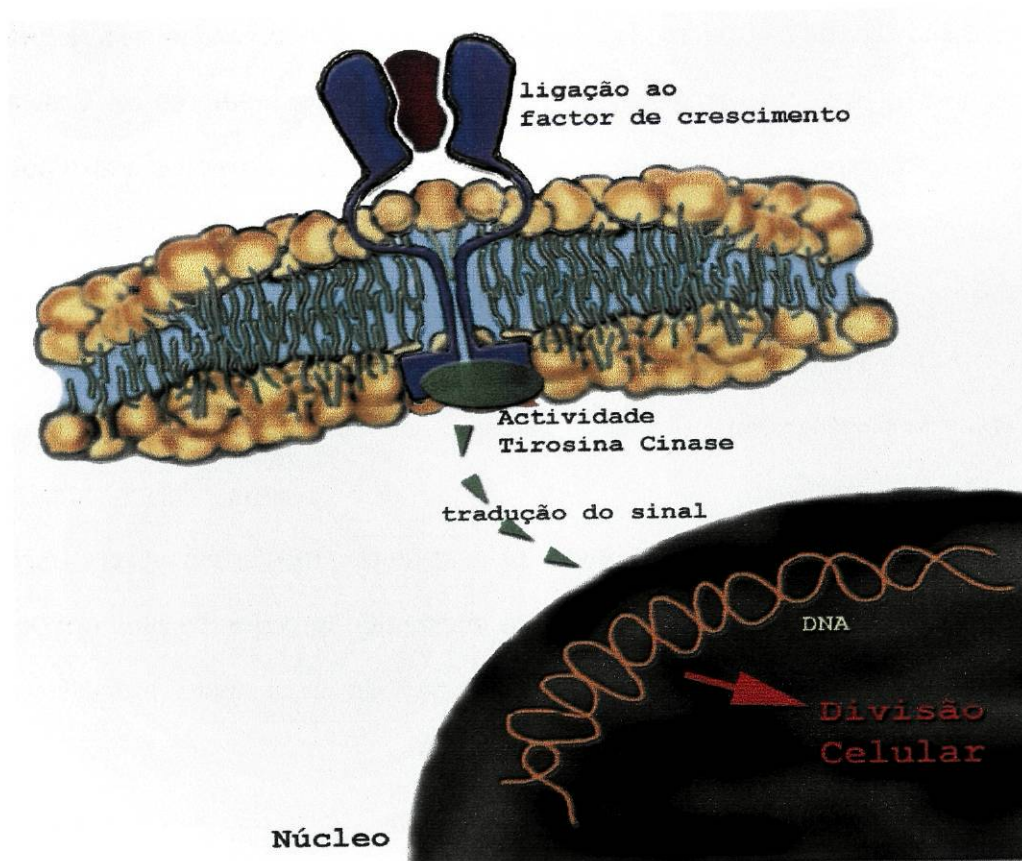


Figura 6 – Mecanismo de acção do receptor HER2 no controlo do crescimento celular.

ACTIVAÇÃO DO ONCOGENE *HER2*

As células possuem duas cópias do proto-oncogene *HER2*. Este gene é expresso num grande número de tecidos, incluindo glândulas mamárias, coração e sistema nervoso (Stern, 2000; Sundaresan, 1999; De Potter *et al.*, 1989), participando activamente no crescimento e desenvolvimento destas células. No entanto, alterações neste gene podem activá-lo, promovendo a sua função oncogénica.

A sequência usual de transformação oncogénica aparenta resultar de uma amplificação inicial do gene *HER2*, o que gera, nas células epiteliais, mais do que as duas cópias referentes aos alelos normais (Liu *et al.*, 1992; Szöllösi *et al.*, 1995). Os factores específicos que induzem a amplificação do gene *HER2* para além das duas cópias normais ainda não estão totalmente elucidados. A amplificação do gene *HER2* leva a uma transcrição aumentada do gene, o que origina níveis aumentados de mRNA de *HER2* e conseqüente aumento da síntese da proteína HER2. A sobre-expressão da proteína HER2 na superfície das células leva, provavelmente, a uma activação constitutiva dos homodímeros de HER2 sem a necessidade de haver ligação dos ligandos, o que vai resultar num crescimento celular desregulado e numa transformação neoplásica passível de originar um tumor. Estas alterações estão relacionadas com a auto-suficiência em factores de crescimento, uma das alterações fisiológicas descritas por Hanahan e Weinberg (2000) como essenciais no desenvolvimento tumoral.

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam claramente que a sobre-expressão da proteína HER2 desempenha um papel importante na transformação oncogénica. Di Fiore e colaboradores (1987) demonstraram, utilizando células NIH 3T3, que a sobre-expressão do HER2 está implicada na transformação e progressão maligna. Para além disso, a expressão do gene mutado *NEU* em

tecidos mamários de ratos transgênicos leva ao aparecimento de carcinoma mamário metastático. A transfecção do gene *HER2* em linhas celulares de tumores humanos da mama e ovário produz características de crescimento mais agressivas, nomeadamente síntese de DNA e taxa de crescimento mais elevadas, com concomitante aumento do potencial tumorigénico e metastático em ratos (Benz *et al.*, 1992; Chazin *et al.*, 1992).

Para além da amplificação, existem outros mecanismos de activação do gene *HER2*. Bargmann e co-autores (1986a) descreveram uma mutação pontual neste gene, que consiste na substituição de uma valina por um ácido glutâmico no resíduo de aminoácido 664, tendo sido associada com a capacidade de transformação celular.

Foi também descrito um polimorfismo no codão 655 (GTV/valina para ATC/isoleucina) na zona que codifica a região transmembranar da proteína (Papewalis *et al.*, 1991). Este polimorfismo tem sido associado a um risco aumentado para desenvolvimento de cancro da mama.

Alterações no gene *HER2* e na sua proteína têm sido extensivamente estudados numa variedade de tumores, incluindo carcinoma da mama (Hayes e Thor, 2002), ovário, colo do útero (Nakano *et al.*, 1997), endométrio, pulmão, bexiga (Vollmer *et al.*, 1997), glândulas salivares e pâncreas (Ross e Fletcher, 1999; Hynes, 1993).

IMPORTÂNCIA DO *HER2* NO CARCINOMA DA MAMA

A amplificação e sobre-expressão do *HER2* têm sido extensivamente estudadas nos carcinomas da mama (Rogers *et al.*, 2002; Révillion *et al.*, 1998). Nos últimos anos diversos estudos referem que este proto-oncogene

está amplificado entre 10 a 30% dos carcinomas da mama (Tsuda *et al.*, 2001).

No que diz respeito ao seu valor prognóstico, estão descritas correlações entre a amplificação do *HER2* e: o envolvimento ganglionar (Hynes, 1993); a sobrevida livre de doença e a sobrevida global dos pacientes (Slamon *et al.*, 1989); o grau do tumor (Tervahauta *et al.*, 1991); cancro da mama metastizado (Jensen *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2002; Yasasever *et al.*, 2000); risco de recorrência (Rodrigues *et al.*, 2003), entre outros. Existem também alguns estudos que demonstram que o *HER2* é um indicador de resposta à terapia, sugerindo grupos de pacientes que beneficiam de um determinado esquema terapêutico (Moliterni *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Têm havido igualmente algumas tentativas de examinar se o valor prognóstico da expressão do *HER2* pode ser aumentado pela determinação simultânea de outros factores de prognóstico, nomeadamente o EGFr (Tsutsui *et al.*, 2003), a proteína P53 (Yamashita *et al.*, 2004) e o receptor de estrogéneos (Joensuu *et al.*, 2003).

IMPORTÂNCIA DO *HER2* EM TUMORES GINECOLÓGICOS

A sobre-expressão do receptor *HER2* no carcinoma do ovário tem sido correlacionada com mau prognóstico, apesar de haver alguma controvérsia nesta associação.

Segundo Kim e colaboradores (1998), parece provável que a determinação de alterações quantitativas dos produtos do oncogene será de extrema importância clínica na classificação de tumores em diferentes categorias de prognóstico, já que as tais alterações a nível molecular podem levar directamente a alterações no comportamento tumoral (Kim *et al.*,

1998). Outros estudos referem que o *HER2* tem valor preditivo em análises de sobrevivência (Hogdall *et al.*, 2003), e que pode contribuir para a quimiossensibilidade de determinados carcinomas do ovário (Smith *et al.*, 2002; Fujimura *et al.*, 2002).

Existem evidências que indicam que o oncogene *HER2* possui um papel importante na iniciação e progressão dos carcinomas da mama e do ovário, tendo-lhe sido atribuído um valor de prognóstico em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global. Seria imperativo obter mais informação acerca do papel deste oncogene noutras vias de carcinogénese, de forma a avaliar se o valor de prognóstico verificado no carcinoma da mama pode ser informativo em outras neoplasias.

O CANCRO DA MAMA

Mais de 95% das neoplasias mamárias ocorrem no tecido epitelial, sendo denominadas carcinomas (Hayes, 2000). Estes carcinomas podem ser subdivididos em diferentes tipos histológicos: ductal, lobular, mucinoso, tubular, papilar, medular, entre outros.

O cancro da mama é a neoplasia que afecta mais mulheres no mundo (Stewart e Kleihues, 2003), com mais de um milhão de novos casos por ano (Baselga e Norton, 2002). Segundo a IARC (*International Agency for Research on Cancer*), estima-se que a taxa de incidência desta neoplasia no ano de 2000 terá sido de 35,7 por 100000 habitantes (ASR – *Age Standardized Rate*) (Ferlay *et al.*, 2001). No entanto, existem diferenças consideráveis nas taxas de incidência e mortalidade entre variados países (figura 7). O risco deste tipo de neoplasia é consideravelmente mais elevado na América do Norte e nos

países do norte da Europa comparativamente com a Ásia e África (Kumar *et al.*, 2003).

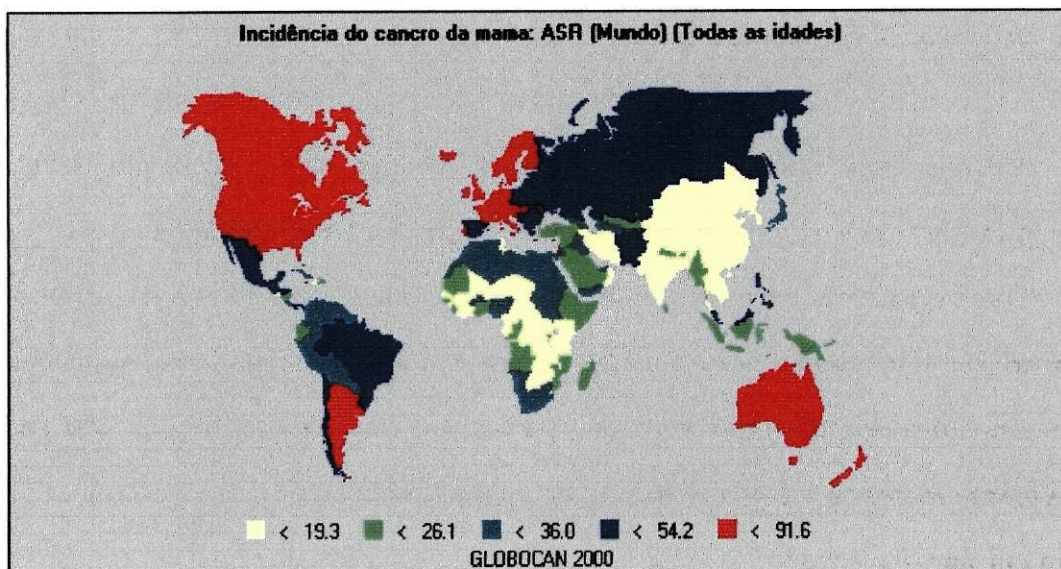


Figura 7 – Incidência do cancro da mama no mundo em 2000 (adaptado de Ferlay *et al.*, 2001).

Mesmo nos vários países europeus, a taxa de incidência de cancro da mama varia consideravelmente, sendo que se observa uma maior incidência nos países de norte, como a Holanda (91,6) e a Dinamarca (86,2); e uma menor incidência nos países de leste como a Lituânia (39,8) e a Macedónia (38,7).

Relativamente à população Portuguesa, o cancro da mama é a neoplasia mais frequente nas mulheres, sendo igualmente a primeira causa de morte por neoplasia (Pinheiro *et al.*, 2003). Os dados mais recentes relativos a Portugal referem que a taxa de incidência de cancro da mama em 2000 terá sido de 73,0 por 100000 habitantes e a taxa de mortalidade de 24,7 por 100000 habitantes (Pinheiro *et al.*, 2002). Estes autores referem ainda, que o risco de desenvolver cancro da mama é de 5,7 enquanto que o risco de falecer desta neoplasia é de 3,1.

FACTORES DE RISCO PARA CANCRO DA MAMA

As variações na incidência de cancro da mama em vários países resultam da interacção entre uma componente genética e agentes ambientais, próprios de cada região. Estão já identificados alguns factores de risco para desenvolver esta neoplasia, sendo que a maioria está relacionada com eventos reprodutivos e níveis hormonais (Feigelson e Henderson, 2000).

Os dois factores de risco identificáveis mais importantes para desenvolver cancro da mama são o sexo e a idade (Hayes, 2000). Esta neoplasia é pouco comum em mulheres com menos de 30 anos, e o risco de desenvolver cancro da mama aumenta rapidamente a partir dessa idade.

No que diz respeito a factores hormonais, estudos epidemiológicos têm identificado alguns factores de risco, nomeadamente idade precoce da menarca, idade tardia da menopausa, nuliparidade e idade tardia da primeira gravidez (Kumar *et al.*, 2003). Todos estes factores estão relacionados com uma exposição a níveis elevados de estrogéneo. A obesidade e a terapia de substituição hormonal em mulheres pós-menopausa são igualmente referidas como factores de risco (Dickson e Lippman, 2001).

Relativamente à história familiar de cancro da mama, apenas 5 a 10% dos cancros da mama estão verdadeiramente associados a uma predisposição hereditária, sendo que estes casos estão normalmente atribuídos a mutações em dois genes de susceptibilidade de alta penetrância, o BRCA 1 e o BRCA2 (Volgstein e Kinzler, 1998). No entanto, é já universalmente aceite que alterações genéticas de baixa penetrância possam estar envolvidas no desenvolvimento de cancro da mama esporádico, sendo que os genes mais estudados neste sentido são os oncogenes *HER2*, *RAS* e *MYC* e os genes supressores tumorais TP53 e RB1 (Kumar *et al.*, 2003, Volgstein e Kinzler, 1998).

Está também associada a susceptibilidade para esta neoplasia, a doença benigna da mama, sendo que o risco varia conforme se trate de doença proliferativa ou não proliferativa.

Por último, existem alguns factores ambientais relacionados com o risco de cancro da mama, tais como: exposição a radiação, uso de contraceptivos orais, amamentação, consumo de álcool e tabaco, dieta rica em gorduras e falta de exercício físico, havendo ainda algumas controvérsias em alguns deles (Roses, 1999; Feigelson e Henderson, 2000).

O CANCRO DO OVÁRIO

A maioria dos tumores do ovário tem origem no tecido epitelial (carcinomas) e inclui os subtipos: seroso, mucinoso, endometrióide, células claras, entre outros (Averette e Nguyen, 1995).

O cancro do ovário ocupa o sexto lugar nas neoplasias com maior incidência nas mulheres em todo o mundo, com uma taxa de incidência de 6,5 por 100000 habitantes (Ferlay *et al.*, 2001). Estima-se que ocorram aproximadamente 190000 novos casos e 114000 mortes por cancro do ovário anualmente (Stewart e Kleihues, 2003). Também nesta neoplasia, há uma grande disparidade nas taxas de incidência quando falamos de países desenvolvidos e países em desenvolvimento (Figura 8).

Na Europa, esta neoplasia é mais incidente na Dinamarca (ASR = 16,1) e na República Checa (15,1), e tem menor incidência na Macedónia (6,8).

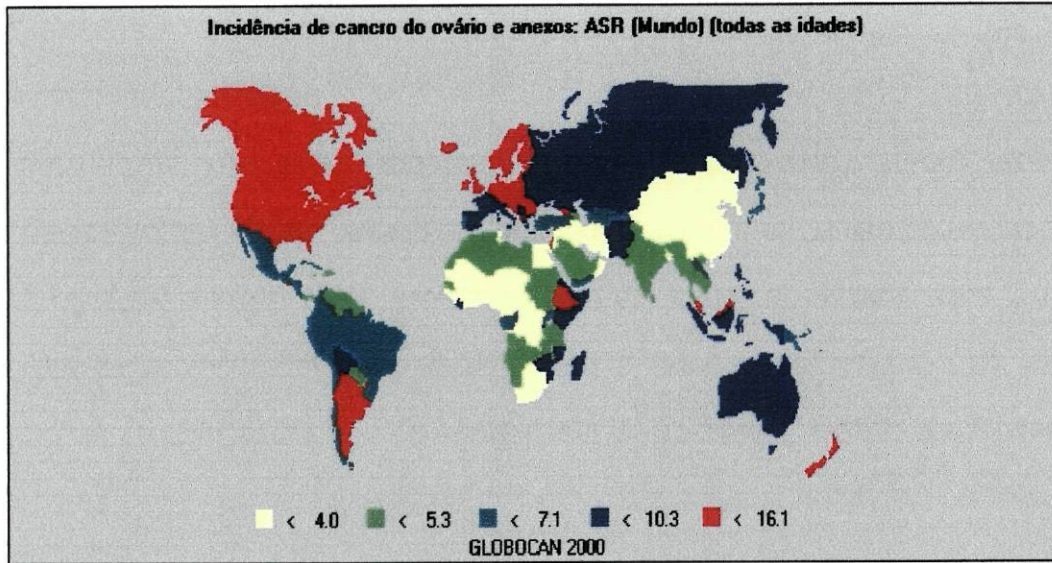


Figura 8 – Incidência do cancro do ovário e anexos no mundo em 2000 (adaptado de Ferlay *et al.*, 2001).

No entanto, o que torna os tumores do ovário tão perigosos não é a sua incidência, mas sim a sua mortalidade, já que o cancro do ovário é o mais letal dos tumores ginecológicos (Stewart e Kleihues, 2003; Pinheiro *et al.*, 2002). Apenas 39% das mulheres com cancro do ovário sobrevive ao fim de 5 anos (Averette e Nguyen, 1995).

No que diz respeito a Portugal, o cancro do ovário é a sexta neoplasia mais incidente em mulheres, com 607 novos casos em 2000 (Pinheiro *et al.*, 2002). Estima-se que a taxa de incidência em 2000 seja de 9,9 por 100000 habitantes, e a taxa de mortalidade 5,4 por 100000 habitantes.

FACTORES DE RISCO PARA CANCRO DO OVÁRIO

Têm sido descritos alguns factores de risco para o desenvolvimento de cancro do ovário, entre os quais se destacam a história familiar e a nuliparidade. Existe uma maior incidência de carcinoma do ovário em mulheres solteiras e mulheres casadas com poucos filhos (Kumar *et al.*, 2003). Curiosamente, pensa-se que o uso de contraceptivos orais reduza o risco desta neoplasia.

Também nestas neoplasias, a idade é um factor muito importante. A maioria dos carcinomas epiteliais do ovário ocorre em mulheres pós-menopausa, em que a idade média de diagnóstico é de 63 anos (Ozols *et al.*, 2001).

Em relação à história familiar, e em concordância com o que acontece no cancro da mama, estão descritas mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. No entanto, menos de 10% dos cancros do ovário são hereditários (Ozols *et al.*, 2001). Têm sido encontradas alterações genéticas em tumores esporádicos do ovário; alterações essas que podem ocorrer em oncogenes (*HER2*, *AKT2*), genes supressores tumorais (*TP53*) e genes envolvidos na adesão celular (Caderina E), entre outros (Chambers, 2001; Vogelstein e Kinzler, 1998).



OBJECTIVOS

Foram objectivos deste trabalho:

- Analisar a frequência do polimorfismo no codão 655 do gene *HER2* num grupo de indivíduos sem qualquer patologia, bem como em mulheres com carcinoma da mama e ovário;
- Verificar a existência de associações entre a frequência do polimorfismo estudado e a susceptibilidade para carcinoma da mama e ovário;
- Definir subgrupos de indivíduos com maior susceptibilidade para cancro da mama e ovário, de acordo com o seu genótipo.



MATERIAL E MÉTODOS

POPULAÇÃO

Neste trabalho foi realizado um estudo do tipo caso-controlo em quatrocentas e vinte e oito (428) mulheres. Todas as amostras estudadas são provenientes de indivíduos da região norte de Portugal.

INDIVÍDUOS CONTROLO

O grupo de indivíduos controlo consistia em cento e quarenta e seis (146) mulheres sem qualquer patologia oncológica, com uma idade média de 50,94 anos, desvio padrão (dp) de 14,30 e mediana de 49 anos.

PACIENTES COM CANCRO DA MAMA

Foram analisadas amostras referentes às primeiras amostras de cento e cinquenta e duas (152) mulheres com carcinoma da mama diagnosticado no Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional de Oncologia do Porto, e que deram entrada no Laboratório de Patologia Molecular entre 2000 e 2002. A idade média de diagnóstico é de 47,9 anos (dp de 12,62) e a mediana de 46 anos. Na altura do diagnóstico foram avaliadas as seguintes características clínico-patológicas: tipo e grau histológico, envolvimento ganglionar e estágio, de acordo com a AJCC – *American Joint Committee on Cancer* (1997). Em alguns casos não foi possível obter informação relativamente a estas características. Estes dados estão descritos no quadro I.

Quadro I – Características clínico-patológicas dos casos de carcinoma da mama.

		Frequência	%	% válida
Tipo histológico	CIS	5	3,3	3,4
	ductal invasor	125	82,2	85,6
	lobular	8	5,3	5,5
	medular	3	2,0	2,1
	micropapilar	2	1,3	1,4
	mucinoso	2	1,3	1,4
	metaplásico invasor	1	0,7	0,7
	Total	146	96,1	100,0
	Sem informação	6	3,9	
Total		152	100,0	
		Frequência	%	% válida
Grau histológico	1	14	9,2	10,6
	2	81	53,3	61,4
	3	37	24,3	28,0
	Total	132	86,8	100,0
	Sem informação	20	13,2	
Total		152	100,0	
		Frequência	%	% válida
Estádio	0	3	2,0	2,2
	I	33	21,7	23,7
	II	84	55,3	60,4
	III	18	11,8	12,9
	IV	1	0,7	0,7
	Total	139	91,4	100,0
	Sem informação	13	8,6	
Total		152	100,0	
		Frequência	%	% válida
Metástases ganglionares	não	66	43,4	47,8
	sim	72	47,4	52,2
	Total	138	90,8	100,0
	Sem informação	14	9,2	
Total		152	100,0	

CIS – Carcinoma *in situ*.

PACIENTES COM CANCRO DO OVÁRIO

Relativamente ao grupo de casos com cancro do ovário, era constituído pelas primeiras amostras de cento e trinta (130) mulheres com neoplasia do ovário, que deram entrada no Laboratório de Patologia Molecular, entre 2000 e 2002. A idade média de diagnóstico é de 55,22 anos (dp de 13,41) e a mediana de 55 anos.

Neste grupo de casos incluem-se 101 casos de carcinoma do ovário, 4 casos de malignidade intermédia (*borderline*) e 23 casos de tumores benignos do ovário. Não obtivemos informação do grau de malignidade em dois casos. Relativamente aos casos com tumores malignos e de malignidade intermédia foram avaliadas as seguintes características: estadiamento segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Oncologia – FIGO (Shepherd, 1989), grau de diferenciação e ocorrência de recidiva ou progressão da doença (Quadro II).

Quadro II – Características clínico-patológicas dos casos de carcinoma do ovário.

		Frequência	%	% Válida
Estadio	I	32	30,5	36,8
	II	8	7,6	9,2
	III	38	36,2	43,7
	IV	9	8,6	10,3
	Total	87	82,9	100,0
	Sem informação	18	17,1	
Total		105	100,0	
		Frequência	%	% Válida
Tipo Histológico	seroso	59	56,2	57,3
	mucinoso	16	15,2	15,5
	células claras	10	9,5	9,7
	endometrióide	7	6,7	6,8
	outro	11	10,5	10,7
	Total	103	98,1	100,0
	Sem informação	2	1,9	
Total		105	100,0	
		Frequência	%	% Válida
Grau de diferenciação	bem	17	16,2	25,0
	moderado	17	16,2	25,0
	pouco	34	32,4	50,0
	Total	68	64,8	100,0
	Sem informação	37	35,2	
Total		105	100,0	
		Frequência	%	% Válida
Recidiva/Progressão	não	48	45,7	49,5
	sim	49	46,7	50,5
	Total	97	92,4	100,0
	Sem informação	8	7,6	
Total		105	100,0	

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram recolhidos aproximadamente 8 ml de sangue periférico dos indivíduos acima referidos, através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa, para tubos com EDTA.

O isolamento de DNA genómico foi efectuado pela técnica mista *salting-out*-clorofórmio (Müllenbach, 1989) a partir de células nucleadas do sangue periférico.

Às amostras de sangue periférico adicionou-se uma solução hipotónica, AKE, de modo a provocar a lise dos eritrócitos, e incubou-se a 4°C durante 30 minutos. Centrifugou-se a 2000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos a 4°C, ressuspendeu-se o sedimento na solução hipotónica, seguindo-se uma nova centrifugação a 2000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se novamente o sedimento, desta vez em PBS, seguindo-se uma terceira e última centrifugação a 2000 rpm (durante 10 minutos a 4°C).

Uma vez obtido o sedimento de células, desprezou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o sedimento em 4 ml de tampão SE, provocando a lise das células nucleadas; adicionou-se SDS (dodecilsulfato de sódio, Gibco BRL 5525UA), de modo a promover a dissociação do DNA das proteínas. Adicionou-se proteinase K (Boehringer Mannheim 745723) (concentração final de 200 µg/ml) e incubou-se a 55°C durante 12 horas para completa degradação proteica.

Adicionou-se 1 ml de NaCl 6 M previamente aquecido, para uma concentração final de 1,5 M, com o objectivo de precipitar as proteínas (*salting-out*). A separação das proteínas foi efectuada pela adição de igual volume de clorofórmio (Merck 1124451000) e agitação suave durante 30 a 60 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 2500 rpm, durante 10 minutos a 4°C de modo a separar a fase aquosa, que contém o DNA, da fase orgânica, onde se encontram as proteínas degradadas. A fase aquosa foi recolhida e foi-lhe adicionado igual volume de isopropanol (Panreac cod131090), promovendo assim a precipitação do DNA.

Este, uma vez recolhido, foi lavado com etanol (Merck 1009831000) a 70% (p/v). Após completa evaporação do etanol, o DNA foi ressuspensão em água bidestilada.

As amostras foram armazenadas a 4°C ou -20°C conforme o tempo de armazenamento previsto.

AMPLIFICAÇÃO DO DNA

O DNA obtido foi amplificado pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) de modo a obter um fragmento de 148 pares de base (pb) correspondente à região do gene *HER2*. A reacção foi efectuada num termociclador programável Biometra *T-Gradient* num volume total de 50 µl, que continha cerca de 10 ng de DNA, 1U Taq DNA Polimerase (MBI Fermentas, #EP0402) e o respectivo tampão de reacção 1X, 1,5 mM de MgCl₂ (MBI Fermentas), 0,2 mM de dinucleosídeos trifosfato (dNTP) (MBI Fermentas, #R0192) e 1 µM de *primers* específicos para a região que queríamos amplificar (F: 5' AGA GCG CCA GCC CTC TGA CGT CCA T 3' e R: 5' TCC GTT TCC TGC AGC AGT CTC CGC A 3'). As condições da reacção foram as seguintes: pré-desnaturação durante 30 segundos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C e 30 segundos a 72°C, com um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

IDENTIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA

De modo a verificar a amplificação do fragmento de DNA, 15 µl dos produtos obtidos na PCR foram analisados por electroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), corados com brometo de etídeo. Em seguida os géis foram visualizados, utilizando uma lâmpada de luz ultra-violeta, num aparelho *Image Master VDS* (*Pharmacia Biotech*).

ANÁLISE DO POLIMORFISMO HER2

Na análise do polimorfismo estudado foi utilizado o método de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Cerca de 15 µl dos produtos de PCR foram submetidos a digestão com 1U de *BsmAI* (Fermentas #ER0032), juntamente com o respectivo tampão, durante 20 horas a 37°C.

IDENTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR RFLP

Os fragmentos obtidos por RFLP foram analisados por electroforese em géis de agarose a 3% (p/v), corados com brometo de etídeo. A enzima de restrição utilizada reconhece a sequência GTC, originando dois fragmentos de 116 e 32 pb. Desta forma, podemos observar nos géis de agarose os vários genótipos possíveis.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS (Versão 11.5, SPSS Inc., 1996).

A análise pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2) foi utilizada para comparação das variáveis categóricas. O valor de p foi obtido pelo teste de χ^2 , ou pelo teste de Fisher quando o número de indivíduos considerados (n) foi inferior a 5, e foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0.05. O valor *Odds Ratio* (OR) indica o factor de risco para determinado acontecimento num estudo do tipo caso-controlo, e foi calculado juntamente com o seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para medir a associação entre os alelos, genótipos e fenótipos do gene *HER2* e risco para cancro.

Foi calculada a Proporção Atribuível (AP - *Attributable Proportion*), de acordo com o método previamente descrito por Schiffman e colaboradores (1993). Para tal utilizou-se a fórmula: $AP = PRF \times (1 - 1/OR)$. A Proporção Atribuível é definida como a fracção de doença atribuível a um dado factor de risco; PRF é a percentagem do factor de risco nos casos e OR é o *Odds Ratio*.



RESULTADOS

AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Foi utilizada a técnica de PCR para amplificação do gene *HER2*. O fragmento de DNA correspondente à zona do gene que pretendíamos amplificar possui um peso de 148 pb. Foi possível confirmar esta amplificação através de electroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), corados com brometo de etídeo (Figura 9), e utilizando um marcador molecular com um peso conhecido (marcador de 100 pb).

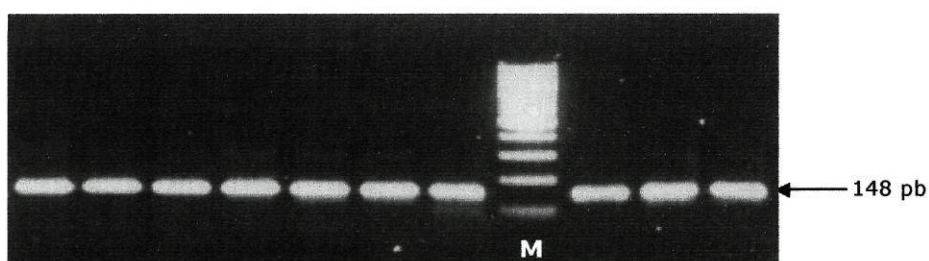


Figura 9 – Gel de agarose a 1,5%, exemplificando a banda de 148 pb, correspondente à região do *HER2* amplificada (M – marcador molecular de 100 pb).

ANÁLISE DO POLIMORFISMO *HER2*

A técnica RFLP permitiu a análise dos vários genótipos *HER2* possíveis. Os produtos resultantes da PCR foram submetidos a uma digestão enzimática, após a qual se obtiveram os fragmentos de RFLP. Nesta análise, foi utilizada a enzima de restrição *BsmAI*, que reconhece a sequência GTC, dando origem a dois fragmentos de 116 e 32 pb.

Através da visualização dos géis de agarose a 3% (Figura 10), podemos observar três possibilidades: uma banda única de 148 pb, correspondente ao genótipo homocigótico Ile/Ile (A/A); uma banda de 148 pb e uma banda de

116 pb, correspondente ao genótipo heterozigótico Ile/Val (A/G); ou uma banda única de 116 pb, correspondente ao genótipo homozigótico Val/Val (G/G). A banda de 32 pb, por possuir um peso molecular muito baixo, não é visível nos géis de agarose.

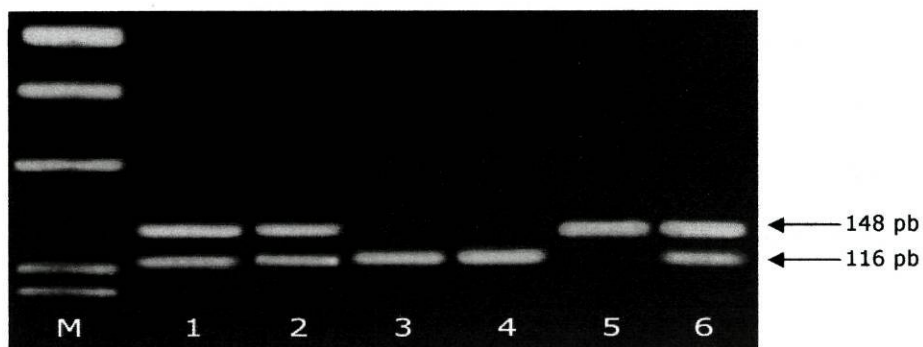


Figura 10 - Gel de agarose a 3%, exemplificando os três padrões RFLP obtidos. M - marcador molecular de 100 pb; Casos 1, 2 e 6 - heterozigóticos (genótipo Ile/Val); casos 3 e 4 - homozigóticos Val/Val; caso 5 - homozigótico Ile/Ile.

FREQUÊNCIAS DO POLIMORFISMO HER2 NOS INDIVÍDUOS CONTROLO

FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Nos indivíduos controlo, obtivemos uma frequência do alelo Ile de 0.85 e uma frequência do alelo Val de 0.15. Relativamente aos genótipos, 73.3% dos indivíduos possuem genótipo Ile/Ile, 24.0% possuem genótipo Ile/Val e 2.7% apresentam genótipo Val/Val.

COMPARAÇÃO COM OUTRAS POPULAÇÕES

Existem, descritos na literatura, estudos referentes a este polimorfismo, em diferentes populações. Estão relatados estudos em populações Caucásicas (Ameyaw *et al.*, 2000; Baxter e Campbell, 2001; Keshava *et al.*, 2001; Wang-Gohrke e Chang-Claude, 2001; Millikan *et al.*, 2003; Montgomery *et al.*, 2003), Afro-americanas (Ameyaw *et al.*, 2000; Keshava *et al.*, 2001; Millikan *et al.*, 2003), Chineses (Xie *et al.*, 2000), Japoneses (Hishida *et al.*, 2002), Latinas (Keshava *et al.*, 2001), Africanas (Ameyaw *et al.*, 2000, 2002) e Ashkanasim (Rutter *et al.*, 2003).

Através de análise estatística, utilizando o teste do χ^2 , efectuámos uma comparação entre os nossos resultados e as frequências descritas na literatura, referentes a estas populações (Quadro III).

Pela análise do quadro III, podemos verificar quais as populações que possuem uma frequência do alelo Val estatisticamente semelhante ou diferente dos nossos resultados. Sendo assim, verificamos que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os nossos resultados e as populações: Australiana ($p=0.111$); Latina ($p=0.640$); Chinesa ($p=0.115$); Japonesa ($p=0.114$); Filipina ($p=0.937$); Saudita ($p=0.085$); Sudanesa ($p=0.215$); Ashkenazim ($p=0.412$; $p=0.884$); e ainda duas populações caucásicas dos Estados Unidos da América ($p=0.060$; $p=0.705$).

Pelo contrário, podemos afirmar com 95% de confiança, que a frequência do alelo Val do nosso estudo é diferente da frequência do alelo Val nas populações: Afro-Americanas ($p=0.012$; $p=0.009$; $p < 0.001$); Africana, do Ghana ($p < 0.001$); Quênia ($p < 0.001$); Caucásica da Inglaterra ($p < 0.001$); Caucásica, Alemã ($p=0.001$) e ainda uma população caucásica dos EUA ($p=0.001$).

Quadro III – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *HER2* em várias populações.

População	N.º de indivíduos	Frequência genotípica			Frequência alelo Val	p *	Referência
		Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val			
Caucasiana, Portugal	142	0.732	0.239	0.028	0.15	referência	Nosso estudo
Caucasiana, Inglaterra	256	0.539	0.394	0.066	0.26	0.000	Baxter e Campbell, 2001
Caucasiana, Alemanha	1078	0.599	0.347	0.054	0.23	0.001	Wang-Gohrke e Chang-Claude, 2001
Caucasiana, EUA	1132	0.604	0.331	0.065	0.23	0.001	Millikan et al., 2003
Caucasiana, EUA	257	0.654	0.292	0.054	0.20	0.060	Ameyaw et al., 2000
Caucasiana, EUA	180	0.717	0.244	0.039	0.16	0.705	Keshava et al., 2001
Australiana	299	0.656	0.314	0.030	0.19	0.111	Montgomery et al., 2003
Latina	77	0.753	0.234	0.013	0.13	0.640	Keshava et al., 2001
Afro-Americana	90	0.567	0.389	0.044	0.24	0.012	Ameyaw et al., 2000
Afro-Americana	63	0.905	0.095	0	0.05	0.009	Keshava et al., 2001
Afro-Americana	676	0.896	0.104	0	0.05	0.000	Millikan et al., 2003
Africana, Ghana	200	1.000	0	0	0	0.000	Ameyaw et al., 2000
Africana, Quênia	114	0.974	0.260	0	0.01	0.000	Ameyaw et al., 2002
Africana, Sudão	52	0.827	0.173	0	0.09	0.115	Ameyaw et al., 2002
Chinesa	359	0.780	0.217	0.003	0.11	0.114	Xie et al., 2000
Japonesa	184	0.739	0.223	0.038	0.15	0.937	Hishida et al., 2002
Filipina	73	0.837	0.150	0.013	0.09	0.085	Ameyaw et al., 2002
Saudita	101	0.802	0.178	0.002	0.11	0.215	Ameyaw et al., 2002
Ashkenazim, EUA	1375	0.761	0.224	0.015	0.13	0.412	Rutter et al., 2003
Ashkenazim, Israel	185	0.730	0.240	0.030	0.15	0.884	Rutter et al., 2003

p* - valor de p, obtido pelo teste de χ^2 , na comparação da frequência do alelo Val, entre a nossa população e as restantes.

PACIENTES COM CANCRO DA MAMA

No quadro IV descrevem-se as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo *HER2* no grupo de pacientes com Cancro da mama (casos), bem como uma comparação destes resultados com o grupo controlo.

Quadro IV – Frequências alélicas e genóticas nos casos de cancro da mama e nos controlos.

	Casos (n=152)		Controlos (n=146)		p	O.R.	95% CI
	n	%	n	%			
Alelos*							
A (Ile)	233	76.6	249	85.3		1.00	Referência
G (Val)	71	23.3	43	14.7	0.007	1.77	1.11-2.68
Genótipos							
Ile/Ile	88	57.9	107	73.3		1.00	Referência
Ile/Val	57	37.5	35	23.9	0.008	1.98	1.19-3.29
Val/Val	7	4.6	4	2.8	0.231	2.29	0.60-7.51
Ile/Ile	88	57.9	107	73.3		1.00	Referência
Portador Val	64	42.1	39	26.7	0.005	2.00	1.23-3.25
Idade ≤46							
Ile/Ile	46	59.7	39	66.1		1.00	Referência
Portador Val	31	40.3	20	33.9	0.448	1.31	0.65-2.66
Idade >46							
Ile/Ile	40	54.8	66	78.6		1.00	Referência
Portador Val	33	45.2	18	21.4	0.002	3.03	1.51-6.07

* - Total de alelos nos casos de cancro da mama = 304; no grupo controlo = 292.

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; O.R. - *Odds Ratio*; 95% CI - intervalo de confiança a 95%.

No grupo de pacientes com cancro da mama, a frequência do alelo Ile foi de 0.77 e a frequência do alelo Val foi de 0.23. Podemos afirmar com 95% de confiança que a frequência alélica é diferente nos casos com cancro da mama e nos controlos ($p = 0.007$), e que o alelo Val confere um risco de 1.77 vezes superior (95% CI: 1.11 – 2.68).

A frequência do genótipo Ile/Val foi maior nos casos (37.5%) do que nos controlos (24.0%), e o mesmo foi observado para o genótipo Val/Val (4.6% e 2.7%, respectivamente). Foi encontrado um risco de cancro da mama duas vezes superior nas mulheres portadoras de pelo menos um alelo Val – genótipos Ile/Val e Val/Val (OR = 2.00; 95% CI 1.23 – 3.25; $p = 0.005$).

Quando se estratificou os casos tendo em conta a mediana das idades (mulheres com mais de 46 anos *versus* mulheres com menos de 46 anos), esta associação é ainda mais forte. Neste caso, obteve-se um aumento de três vezes no risco para cancro da mama em mulheres com mais de 46 anos portadoras de pelo menos um alelo Val (OR = 3.03; 95% CI 1.51-6.07; $p = 0.002$).

Foi calculada a proporção de casos de cancro da mama atribuível (AP) à influência dos genótipos portadores de um alelo Val, que foi de 21.05%.

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS TENDO EM CONTA CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Foram analisadas diversas características clínico-patológicas dos casos de cancro da mama, no sentido de avaliar se existe alguma influência do polimorfismo *HER2* na agressividade tumoral, já que este gene tem sido relatado como possível marcador molecular de prognóstico.

Na figura 9, podemos ver a distribuição dos genótipos *HER2* nos vários estádios e nos diferentes graus de diferenciação dos casos de cancro da mama. De notar que o único caso com estágio IV apresenta um genótipo portador do alelo Val.

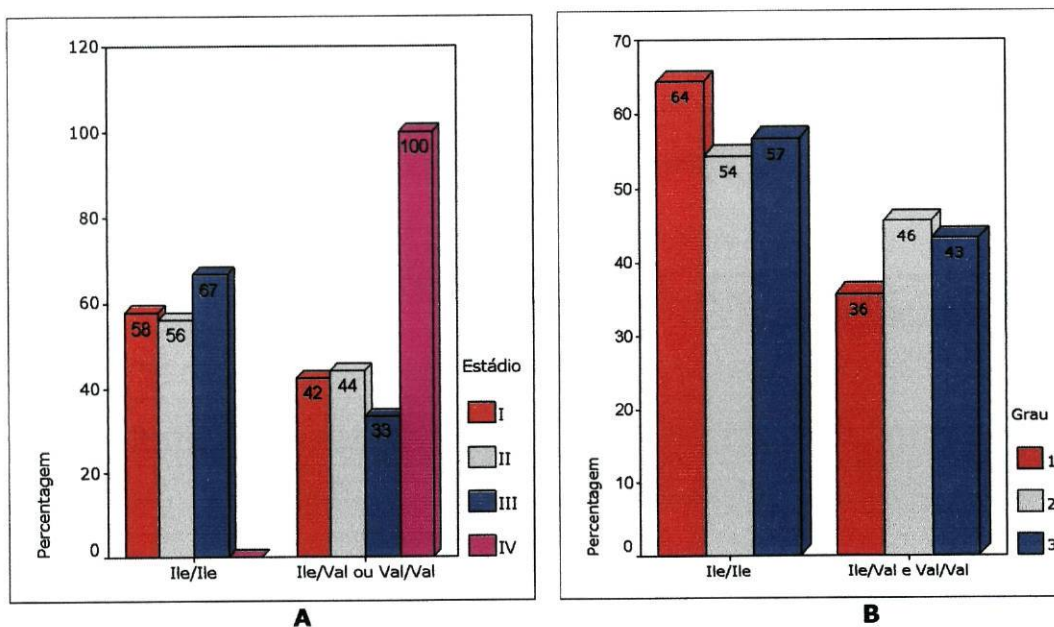


Figura 9 – Representação gráfica da distribuição dos diferentes estádios tumorais (A) e graus de diferenciação (B) dos carcinomas da mama, consoante o seu genótipo.

No quadro V descrevem-se os resultados da análise estatística referente aos genótipos *HER2* nas diferentes características clínico-patológicas.

Foi efectuada uma re-codificação do estágio, de forma a comparar os estádios menos agressivos (I e II) com os estádios mais agressivos (III e IV). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0.581$) nas frequências genotípicas nestes dois grupos de casos.

O mesmo foi observado para os diferentes graus de diferenciação ($p=0.782$). Foi também avaliada a presença ou ausência de metastização ganglionar regional. Também neste caso, não se verificou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.435$).

Quadro V – Frequência dos genótipos *HER2* nos subgrupos de casos de cancro da mama, tendo em conta o estágio, grau de diferenciação e metástases ganglionares.

		Genótipos		p
		Ile/Ile	Ile/Val e Val/Val	
Estádio	I/II	66	51	0.581
	III/IV	12	7	
Grau de diferenciação	I	9	5	0.782
	II	44	37	
	III	21	16	
Metástases ganglionares	sim	44	28	0.435
	não	36	30	

PACIENTES COM NEOPLASIA DO OVÁRIO

FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

A frequência do alelo Ile no total dos casos de neoplasia do ovário foi de 0.70 e a frequência do alelo Val foi de 0.30. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação às frequências observadas no grupo controlo ($p= 0.127$).

Do mesmo modo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas entre os dois grupos ($p=0.119$) (quadro VI). O mesmo se verifica quando se estratificaram os casos tendo em conta a mediana da idade (mulheres com mais de 55 anos *versus* mulheres com menos de 55 anos).

Quadro VI – Frequências genotípicas nos casos de neoplasia do ovário e nos controles.

	Casos (n=130)		Controlos (n=146)		p	O.R.	95% CI
	n	%	n	%			
Genótipos							
Ile/Ile	84	64.6	107	73.3		1.00	Referência
Portador Val	46	35.4	39	26.7	0.119	1.50	0.90-2.51
Idade ≤ 55							
Ile/Ile	42	66.7	68	71.6		1.00	Referência
Portador Val	21	33.3	27	28.4	0.511	1.26	0.63-2.51
Idade >55							
Ile/Ile	41	62.1	37	77.1		1.00	Referência
Portador Val	25	37.9	11	22.9	0.090	2.05	0.89-4.74

p – valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; O.R. – Odds Ratio; 95% CI – intervalo de confiança a 95%.

Com o intuito de avaliar a influência do polimorfismo *HER2* na agressividade dos tumores, estratificou-se os casos de neoplasia do ovário consoante a sua malignidade (tumores benignos *versus* carcinomas).

FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS NOS TUMORES BENIGNOS

Foram calculadas as frequências genotípicas para os tumores benignos (quadro VII), e a mesma análise foi efectuada tendo em conta a mediana da idade do grupo com tumores benignos (50 anos). Verificou-se que os genótipos portadores do alelo Val eram mais frequentes no grupo com tumores benignos (47.8%) do que no grupo controlo (26.7%). Foi encontrado um risco de tumor benigno do ovário 2.55 vezes superior nas mulheres que possuíam pelo menos um alelo Val – genótipos Ile/Val e Val/Val (OR = 2.55; 95% CI 1.03-6.16; p = 0.039).

Quadro VII – Frequências genótípicas nos casos de tumores benignos do ovário e nos controlos.

	T. benignos (n=23)		Controlos (n=146)		p	O.R.	95% CI
	n	%	n	%			
Genótipos							
Ile/Ile	12	52.2	107	73.3		1.00	Referência
Portador Val	11	47.8	39	26.7	0.039	2.52	1.03-6.16
Idade ≤ 50							
Ile/Ile	5	50.0	52	67.5		1.00	Referência
Portador Val	5	50.0	25	32.5	0.272	2.08	0.55-7.85
Idade >50							
Ile/Ile	7	53.8	53	80.3		1.00	Referência
Portador Val	6	46.2	13	19.7	0.041	3.50	1.00-12.17

p – valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; O.R. – Odds Ratio; 95% CI – intervalo de confiança a 95%.

Quando os casos foram estratificados tendo em conta a mediana da idade (mulheres com mais de 50 anos *versus* mulheres com menos de 50 anos), esta relação é ainda mais forte para as mulheres com mais de 50 anos (OR = 3.50; 95% CI 1.00-12.17; p = 0.041).

No grupo de pacientes com tumores benignos do ovário, a frequência do alelo Ile foi de 0.72 e a frequência do alelo Val foi de 0.28. Podemos afirmar com 95% de confiança que a frequência alélica dos casos com tumores benignos do ovário é diferente do que nos controlos (p= 0.022), e que o alelo Val confere um risco de 2.28 vezes superior (95% CI: 1.04 – 4.94).

Foi calculada a proporção de casos de tumores benignos atribuível (AP) à influência dos genótipos portadores de um alelo Val, que foi de 28,8%.

FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS NOS TUMORES MALIGNOS

No grupo de pacientes com carcinomas do ovário, a frequência do alelo Ile foi de 0.82 e a frequência do alelo Val foi de 0.18. Comparando com o grupo de indivíduos controlo, em que a frequência do alelo Ile é 0.85 e a frequência do alelo Val é 0.15, observou-se ausência de diferença estatisticamente significativa ($p= 0.311$).

Relativamente às frequências genotípicas (quadro VII), verificou-se que os genótipos portadores do alelo Val eram mais frequentes no grupo com tumores malignos (33.3%) do que no grupo controlo (26.7%). No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0.256$). Esta diferença é mais notória em mulheres com mais de 56 anos (36.5% *versus* 26.2%), não se sendo ainda estatisticamente significativa ($p=0.285$).

Quadro VIII – Frequências genotípicas nos casos de carcinoma do ovário e nos controlos.

	Carcinomas (n=105)		Controlos (n=146)		p	O.R.	95% CI
	n	%	n	%			
Genótipos							
Ile/Ile	70	66.7	107	73.3		1.00	Referência
Portador Val	35	33.3	39	26.7	0.256	1.37	0.79-2.37
Idade ≤ 56							
Ile/Ile	36	69.2	74	73.3		1.00	Referência
Portador Val	16	30.8	27	26.7	0.599	1.22	0.58-2.54
Idade >56							
Ile/Ile	33	63.5	31	73.8		1.00	Referência
Portador Val	19	36.5	11	26.2	0.285	1.62	0.67-3.95

p – valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; O.R. – Odds Ratio; 95% CI – intervalo de confiança a 95%.

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS TENDO EM CONTA CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

O grupo de carcinoma do ovário foi estratificado consoante o seu estágio, grau de diferenciação e ocorrência/ausência de recidiva ou progressão, de modo a analisar uma possível influência dos genótipos *HER2* na agressividade deste tipo de tumores.

Na figura 10, está representada a distribuição dos genótipos *HER2* nos vários estádios e nos diferentes graus de diferenciação dos casos de carcinoma do ovário.

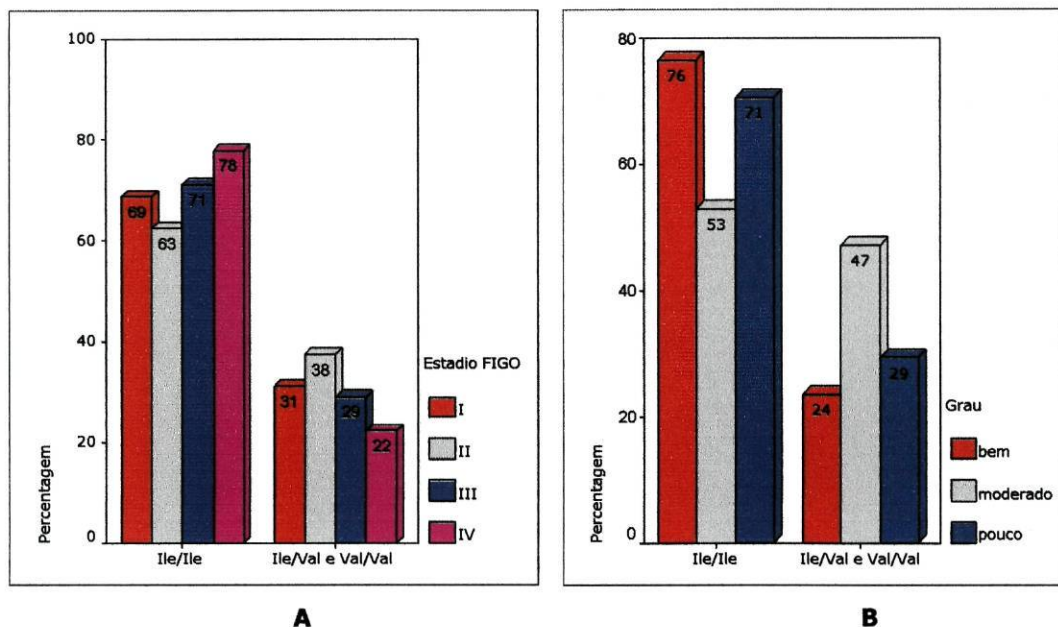


Figura 10 - Representação gráfica da distribuição dos diferentes estádios tumorais (A) e graus de diferenciação (B) dos carcinomas de ovário, consoante o seu genótipo.

No quadro IX apresentam-se os resultados da análise estatística referente aos genótipos *HER2* nas diferentes características clínico-patológicas dos casos de carcinoma do ovário. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na frequência genotípica nos subgrupos

analisados (estádio I/II *versus* III/IV, $p=0.439$; grau de diferenciação, $p=0.298$; recidiva/progressão, $p=0.820$).

Quadro IX – Frequência dos genótipos *HER2* nos subgrupos de casos de carcinoma do ovário, tendo em conta o estágio, grau de diferenciação e recidiva/progressão.

		Genótipos		p
		Ile/Ile	Ile/Val e Val/Val	
Estádio	I/II	25	13	0.439
	III/IV	36	13	
Grau de diferenciação	bem	13	4	0.298
	moderado	9	8	
	pouco	24	10	
Recidiva/Progressão	sim	32	18	0.820
	não	44	27	



DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o cancro tem sido visto como uma doença complexa e multivariada, e tem sido dada particular atenção à base genética dos tumores. Neste sentido, a procura e compreensão de alterações genéticas responsáveis pelo aparecimento de um tumor, são importantes passos na investigação oncológica.

O gene *HER2* é um proto-oncogene envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento celular, e consequentemente, alterações neste gene poderão estar envolvidas na carcinogénese. Polimorfismos no gene *HER2* têm sido analisados em algumas populações, com resultados controversos.

O nosso estudo teve como objectivos analisar a frequência do polimorfismo no codão 655 do gene *HER2* num grupo de indivíduos sem qualquer patologia, e verificar a existência de associações entre a frequência do polimorfismo estudado e a susceptibilidade para carcinoma da mama e ovário.

A técnica utilizada, PCR-RFLP, permitiu a detecção dos três genótipos possíveis.

FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO EM INDIVÍDUOS CONTROLO

O polimorfismo no codão 655 do gene *HER2* foi analisado em indivíduos controlo de variadas populações. As frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo apresentam uma grande variabilidade étnica e geográfica nas populações analisadas.

Foi realizada uma análise com o objectivo de comparar a população controlo deste estudo, Caucasiana – Europeia, com outras populações de etnia e localização geográfica tanto semelhantes como diferentes.

Os nossos resultados mostram diferenças entre a frequência alélica da nossa população e de populações Afro-Americanas e Africanas. No entanto, em relação às populações Caucasianas, existem diferenças consideráveis entre os vários estudos. Os nossos resultados são diferentes dos observados nas populações Alemã e Inglesa, e semelhantes aos observados nas populações dos Estados Unidos da América. Estas diferenças indicam que para além da etnia, a localização geográfica poderá ter um papel muito importante. Existem, de facto, estudos que referem que a frequência de determinados polimorfismos varia consideravelmente em diferentes localizações geográficas (Costa *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2002a; Ferreira *et al.*, 2003).

No entanto, há que referir que os indivíduos analisados têm características diferentes em cada estudo, nomeadamente a idade e história familiar de cancro, entre outros factores.

SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DA MAMA

O oncogene *HER2* tem sido proposto como factor de risco para desenvolvimento de carcinomas da mama, sendo igualmente considerado um indicador de mau prognóstico.

No presente trabalho, foi efectuado um estudo do tipo caso – controlo para avaliar a influência do polimorfismo *HER2* na susceptibilidade para cancro da mama. Os nossos resultados indicam um aumento no risco de cancro da mama de duas vezes nas mulheres portadoras de pelo menos um alelo Val – genótipos Ile/Val e Val/Val, sendo que a associação é ainda mais forte para mulheres com idade superior a 46 anos. Cerca de vinte por cento dos casos de cancro da mama são atribuíveis à presença do alelo Val no genótipos.

O polimorfismo analisado ocorre numa localização do gene que codifica a região transmembranar da proteína. Existem evidências que demonstram que o domínio transmembranar da proteína desempenha um papel activo na dimerização e activação do receptor HER2 (Gullick, 2001). Para além disso, um estudo de Fleishman e colaboradores (2002) refere que a presença do aminoácido isoleucina no codão 655 destabiliza a formação de dímeros activos *HER2*. Sendo assim, os genótipos portadores de um alelo Val poderão codificar receptores com capacidade superior de dimerização e activação. A dimerização persistente e a activação constitutiva do receptor levam à emissão contínua de sinais mitóticos para a célula, promovendo assim a carcinogénese.

Em relação aos diferentes estudos do polimorfismo em outras populações, alguns autores referem que o alelo Val confere risco para cancro da mama, enquanto que outros não chegam à mesma conclusão. As diferenças nos resultados podem ser devidas à grande disparidade de indivíduos analisados, bem como à utilização de populações com diferentes localizações geográficas, expostas a ambientes diversificados.

SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DO OVÁRIO

A sobre-expressão do receptor HER2 tem sido bastante estudada em carcinomas do ovário.

Neste trabalho, foi efectuado um estudo tipo caso – controlo para avaliar a influência do polimorfismo *HER2* na susceptibilidade para neoplasias do ovário. Para o grupo total de casos com neoplasia do ovário, não foi encontrada qualquer associação com os genótipos *HER2*. No entanto, ao

subdividir os casos em tumores benignos *versus* malignos, os resultados foram bastante diferentes.

No grupo de tumores benignos observou-se uma sobre-representação do alelo Val. Foi encontrado um risco de tumor benigno do ovário 2.55 vezes superior nas mulheres que possuíam pelo menos um alelo Val – genótipos Ile/Val e Val/Val. Não foi encontrado risco para o grupo de carcinomas.

Estes resultados podem ser explicados pela hipótese de que existem diferentes alterações moleculares nos tumores benignos, *borderline* e malignos (Iwabuchi *et al.*, 1995). Há ainda poucas certezas relativamente aos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de tumores benignos do ovário. Sabe-se, no entanto, que existem alterações que são típicas de carcinomas, enquanto que outras se observam tanto nos cistadenomas como nos carcinomas (Cheng *et al.*, 1996).

Estes resultados, apesar de ainda serem preliminares, poderão ser úteis para perceber o papel que o *HER2* terá no desenvolvimento de tumores do ovário.



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O gene *HER2* é considerado um factor de risco para determinadas neoplasias, e o polimorfismo no codão 655 do gene *HER2* parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento tumoral.

A compreensão da influência das variantes alélicas na actividade do receptor poderá contribuir para um melhor esclarecimento sobre o mecanismo de acção deste polimorfismo no desenvolvimento tumoral.

A análise das variantes alélicas em diferentes populações poderá ser útil na compreensão das diferentes taxas de incidência. Os nossos resultados indicam que a contribuição dos genótipos *HER2* para a susceptibilidade de cancro da mama poderá depender da população estudada, bem como da sua localização geográfica. Será, no entanto, necessário aumentar o número de casos analisados, de modo a obter um maior poder estatístico e uma maior representatividade da amostragem.

Vários estudos publicados pelo nosso grupo sugerem o papel de alguns polimorfismos na susceptibilidade para cancro (Costa *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2002a,b, 2003a,b, 2004 *in press*; Ferreira *et al.*, 2003; Ribeiro R *et al.*, *in press*). Os nossos resultados demonstram que a determinação dos genótipos *HER2*, em associação com outros polimorfismos, poderá ser importante na determinação de um perfil genético individual numa população do sul da Europa.

Além do envolvimento do polimorfismo no gene *HER2* na susceptibilidade para cancro, pretendemos alargar o estudo à área da farmacogenómica, no

sentido de avaliar o seu papel na resposta à terapia. Actualmente, existe terapia especificamente direccionada para o receptor HER2, utilizando um anticorpo monoclonal denominado Trastuzumab (Hoffman-La Roche, 2000). Para além disso, estão em estudo diversas terapias que têm como objectivo inibir a cascata de transdução do sinal, onde o receptor HER2 está envolvido (Goel *et al.*, 2002; Modi *et al.*, 2002). Estão igualmente descritos estudos que demonstram que o HER2 pode ter influência na resistência de alguns tumores à terapia anti-estrogéneos (Kurokama e Arteaga, 2003; Schiff *et al.*, 2003).

Assim, acreditamos que é de extrema relevância a continuação deste projecto, de modo a esclarecer a importância do *HER2* em Oncologia, e, particularmente, segundo uma perspectiva de farmacogenómica.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1986). The product of c-erbB-2 gene: a 185 kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* **232**: 1644-1646.

Ali SM, Leitzel K, Chinchilli VM, Engle L, Demers L, Harvey HA, Carney W, Allard JW, Lipton A (2002). Relationship of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. *Clinical Chemistry* **48(8)**: 1314-1320.

Alroy I, Yarden Y (1997). The ErbB signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interaction. *FEBS Lett* **410**: 83-86.

American Joint Committee on Cancer (1997). AJCC Cancer Staging Manual 5th ed. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers.

Ameyaw MM, Tayeb M, Thornton N, Folayan G, Tariq M, Mobarek A, Evans DAP, Ofori-Adjei D, McLeod HL (2002). Ethnic variation in the HER-2 codon 655 genetic polymorphism previously associated with breast cancer. *J Hum Genet* **47**: 172-175.

Ameyaw MM, Thornton N, McLeod HL (2000). Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **92 (23)**: 1947.

Averette HE, Nguyen H (1995). Gynecologic cancer. In *Clinical Oncology*, 2nd edition (eds Murphy GP, Lawrence W, Lenhard RE); American Cancer Society, USA, págs. 561-566).

Baak JPA, Path FRC, Hermsen MAJA, Meijer G, Schmidt J, Janssen EAM (2003). Genomics and proteomics in cancer. *Eur J Cancer* **39**: 1199-1215.

Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA (1986a). Multiple independent activations of neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* **45**: 649-57.

Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA (1986b). The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor- related protein. *Nature* **319**: 226-230.

Baselga J, Norton L (2002). Focus on breast cancer. *Cancer Cell* **1**: 319-322.

Baxter SW, Campbell IG (2001). Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **93** (7): 557.

Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/*neu*. *Breast Cancer Res Treat* **24**: 85-95.

Bishop JM (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* **235(4786)**: 305-311.

Brookes AJ (1999). The essence of SNPs (Review). *Gene* **234**: 177-186.

Chambers SK (2001). Molecular biology of gynaecologic cancers. In *Cancer: Principles and practice of oncology*, 6th edition (eds DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA); Lippincott Williams and Williams, USA, pág. 1522.

Chazin VR, Kaleko M, Miller AD, Slamon DJ (1992). Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* **7**: 1859-1866.

Cheng PC, Gosewehr JA, Kim TM, Velicescu M, Wan M, Zheng J, Felix JC, Cofer KF, Luo P, Biela BH, Godorov G, Dubeau L (1996). Potential role of the inactivated X chromosome in ovarian epithelial tumor development. *J Nat Cancer Inst* **88**: 510.

Costa S, Medeiros R, Vasconcelos A, Pinto D, Lopes C (2002). A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**: 678-682.

Coughlin SS, Piper M (1999). Genetic polymorphisms and risk of breast cancer (review). *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **8**: 1023-1032.

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* **230**: 1132-1139.

De Potter CR, Quatacker J, Maertens G, Van Daele S, Pauwels C, Verhofstede C, Eechaute W, Roels H (1989). The subcellular localization of the *neu* protein in human normal and neoplastic cells. *Int J Cancer* **44**: 969-974.

Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, King CR, Schlessinger J, Aaronson SA (1987). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* **51**: 1063-1070.

Dickson RB, Lippman ME (2001). Cancer of the breast. In *Cancer: Principles and practice of oncology*, 6th edition (eds DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA); Lippincott Williams and Williams, USA, pág. 1652.

Feigelson HS, Henderson BE (2000). Future possibilities in the prevention of breast cancer; role of genetic variation in breast cancer prevention. *Breast Cancer Research* **2**: 277-282.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2001). *GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0*. IARC CancerBase No. 5. IARCPress, Lyon.

Ferreira PM, Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Morais A, Oliveira J, Lopes C (2003). Association between *CYP2E1* polymorphisms and susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* **12**: 205-211.

Fleishman SJ, Schlessinger J, Bem-Tal N (2002). A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *PNAS* **99(25)**: 15937-12940.

Fujimura M, Katsumata N, Tsuda H, Uchi N, Miyazaki S, Hidaka T, Sakai M, Saito S (2002). HER2 is frequently over-expressed in ovarian clear cell adenocarcinoma: possible novel treatment modality using recombinant

monoclonal antibody against HER2, Trastuzumab. *Jpn J Cancer Res* **93**: 1250-1257.

Goel S, Mani S, Perez-Soler R (2002). Tyrosine kinase inhibitors: a clinical perspective. *Current Oncology Reports* **4**: 9-19.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *EMBO* **16**: 1647-1655.

Gullick WJ (2001). Update on Her-2 as a target for cancer therapy; alternative strategies for targeting the epidermal growth factor system in cancer. *Breast Cancer Res* **3**: 390-394.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hauptmann M, Sigurdson AJ, Chatterjee N, Rutter JL, Hill DA, Doody MM, Struwing JP (2003). Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **95 (16)**: 1251-1252.

Hayes DF (2000). Atlas of Breast Cancer - 2nd edition. Mosby International Limited, England.

Hayes DF, Thor AD (2002). C-erbB-2 in breast cancer: development of a clinical useful marker. *Semin Oncol* **29(3)**: 231-245.

Hishida A, Hamajima N, Iwata H, Matsuo K, Hirose K, Emi N, Tajima K (2002). Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **94 (23)**: 1807-1808.

Hoffman-La Roche (1999). HER2 monograph. Gardiner-Caldwell Communications Limited, UK.

Hoffman-La Roche (2000). Herceptin® - product monograph. Gardiner-Caldwell Communications Limited, UK.

Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Norgaard-Pedersen B, Hogdall CK (2003). Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study. *Cancer* **98(1)**: 66-73.

Hynes NE (1993). Amplification and overexpression of the *erbB-2* gene in human tumors: its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential as a target for cancer therapy. *Cancer Biol* **4**:19-26.

Hynes NE (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. *Breast Cancer Res* **2**: 154-157.

Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, Yang Feng TL, Graw JW (1995). Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* **55**: 6172.

Jensen BV, Johansen JS, Price PA (2003). High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* **9(12)**: 4423-4434.

Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkanen L, Turpeenniemi-Hujanen T, von Smitten K, Lundin J (2003). Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res.* **9(3)**: 923-930.

Keshava C, McCanlies EC, Keshava N, Wolff MS, Weston A (2001). Distribution of *HER2*^{V655} genotypes in breast cancer cases and controls in the United States. *Cancer letters* **173 (1)**: 37-41.

Kim YT, Kim JW, Lee JW (1998). C-erbB-2 oncoprotein assay in ovarian carcinoma and its clinical correlation with prognostic factors. *Cancer Letters* **132**: 91-97.

Kruglyak L (1999). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics* **22**: 139-144.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2003). Robbins Basic Pathology, 7th edition. Saunders, USA.

Kurokama H, Arteaga CL (2003). ErbB (HER) receptors can abrogate antiestrogen action in human breast cancer by multiple signaling mechanisms. *Clin Cancer Res* **9**: 511-515.

Liotta LA, Liu ET (2001). Essentials of Molecular Biology: Genomics and Cancer. In Cancer: Principles and practice of oncology, 6th edition (eds DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA); Lippincott Williams and Williams, USA, pág. 17.

Liu E, Thor A, He M, Barcos M, Ljung BM, Benz C (1992). The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in *in situ* carcinomas of the breast. *Oncogene* **7**: 1027-1032.

Martin A-M, Weber BL (2000). Genetic and hormonal risk factors in breast cancer (review). *J Nat Cancer Inst* **92 (14)**: 1126-1135.

Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Lopes C (2002a). The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility of prostate cancer of a southern European population. *J Hum Genet* **47**: 413-418.

Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Ferreira P, Lopes C (2002b). Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin Cancer Res* **8(11)**:3433-3437.

Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Morais A, Oliveira J, Lopes C (2003a). Steroid hormone genotypes ARStuI and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **41(2)**:91-96.

Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Carrilho S, Oliveira J, Lopes C (2003b). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the

shedding of circulating tumour cells in the blood of prostate cancer patients. *Cancer Lett.* **189(1)**:85-90.

Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Ferreira P, Lobo F, Morais A, Oliveira J, Lopes C (*in press*). Metabolic susceptibility genes and prostate câncer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms. *The Prostate*.

Millikan R, Eaton A, Worley K, Biscocho L, Hodgson E, Huang WY, Geradts J, Iacocca M, Cowan D, Conway K, Dressler L (2003). HER2 codon 655 polymorphism and breast cancer risk in african Americans and whites. *Breast Cancer Res Treat* **79**: 355-364.

Modi S, Seidman AD (2002). An update on epidermal growth factor receptor inhibitors. *Current Oncology Reports* **4**: 47-55.

Molinerti A, Ménard S, Valagussa P, Biganzoli E, Boracchi P, Balsari A, Casalini P, Tomasic G, Marubini E, Pilotti S, Bonadonna G (2003). HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncology* **21(3)**: 458-462.

Montgomery KG, Gertig DM, Baxter SW, Milne RL, Dite GS, McCredie RE, Giles GG, Southey MC, Hopper JL, Campbell IG (2003). The *HER2* I655V polymorphism and risk of breast cancer in women < 40 years. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **12**: 1109-1111.

Mullenbach R, Lagoda PJ, Welter C (1989). An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Genet.* **5(12)**: 391.

Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S (1997). Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* **79**: 513-520.

Ozols RF, Schwartz PE, Eifel PJ (2001). Ovarian Cancer, Fallopian Tube Carcinoma, and Peritoneal Carcinoma. In *Cancer: Principles and practice of oncology*, 6th edition (eds DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA); Lippincott Williams and Williams, USA, pág. 1597).

Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA (1982). Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* **28**: 865-871.

Papewalis J, Nikitin AY, Rajewsky MF (1991). G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic Acid Res* **19**: 5452.

Pharoah PDP, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BAJ (2002). Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nature Genetics* **31**: 33-36.

Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Miranda AC, Limbert E (2002). *Cancer in Portugal*. IARC Technical Publication No 38, Lyon, Paris.

Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Parkin DM (2003). Cancer incidence and mortality in Portugal. *Eur J Cancer* **39**: 2507-2520.

Pinkas-Kramarski R, Eilam R, Alroy I, Levkowitz G, Lonai P, Yarden Y. (1997). Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene* **15**: 2803-2815.

Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance (review). *Eur J Cancer* **34(6)**: 791-808.

Ribeiro R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Morais A, Oliveira J, Lobo F, Lopes C, Medeiros R (*in press*). Overexpressing leptin genetic polymorphism (-2548 G/A) is associated with susceptibility to prostate câncer and risk of advanced disease. *The Prostate*.

Rodrigues NA, Dillon D, Carter D, Parisot N, Haffty BG (2003). Differences in the pathologic and molecular features of intraductal breast carcinoma between younger and older women. *Cancer* **97(6)**: 1393-1403.

Rogers CE, Loveday RL, Drew PJ, Greenman J (2002). Molecular prognostic indicators in breast cancer. *EJSO* **28**: 467-478.

Roses DF (1999). *Breast Cancer*. Churchill Livingstone, New York.

Ross JS, Fletcher JA (1999). The HER-2/ *neu* oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Cancer Biol* **9**: 125-138.

Rutter JL, Chatterjee N, Wacholder S, Struwing J (2003). The *HER2* I655V polymorphism and breast cancer risk in Ashkenazim. *Epidemiology* **14(6)**: 694-700.

Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK (2003). Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signalling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res* **9**: 447-454.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton C, Manos M (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* **85(12)**:958-964.

Scott GK, Dodson JM, Montgomery PA, Johnson RM, Sarup JC, Wong WL, Ullrich A, Shepard HM, Benz CC (1991). p185^{HER2} signal transduction in breast cancer cells. *J Biol Chem* **266**: 14300-14305.

Shepherd JH (1989). Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* **96**: 889-892.

Sherbet GV, Lakshmi MS (1997). The genetics of Cancer. Academic Press, UK.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, *et al.* 1989. Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244 (4905)**:707-712.

Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL 3rd. (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* **269**: 14661-14665.

Smith V, Hobbs S, Court W, Eccles S, Workman P, Kelland LR (2002). ErbB2 overexpression in an ovarian cancer cell line confers sensitivity to the HSP90 inhibitor geldanamycin. *Anticancer Res.* **22(4)**: 1993-1999.

Stern DF (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer; ErbB family receptor tyrosine kinases (review). *Breast Cancer Res* **2**: 176-183.

Stewart BW and Kleihues (2003). *World Cancer Report*. IARC Press, Lyon.

Sundaresan S, Penuel E, Sliwkowski MX (1999). The biology of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2. *Current Oncology Reports* **1**: 16-22.

Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM (1995). ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185^{HER-2} overexpression, and its intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* **55**: 5400-5407.

Tervahauta A, Eskelinen M, Syrjanen S, Lipponen P, Pajarinen P, Syrjanen K (1991). Immunohistochemical demonstration of c-erbB2 oncoprotein expression in female breast cancer and its prognostic significance. *Anticancer Res* **11(5)**: 1677-1681.

Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, Yamamori S, Sakamoto G (2001). Detection of HER-2/*neu* (*c-erb B-2*) DNA amplification in primary breast carcinoma. *Cancer* **92, 12**: 2965-2974.

Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y (2003). Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer. *Surgery* **133(2)**: 219-221.

Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/ neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **16**: 5276-5287.

Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 251-337.

Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, Pereira D, Carrilho S, Palmeira C, Azevedo C, Lopes CS (2002). Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Breast J.* **8(4)**:226-229.

Volgestein B, Kinzler KW (1998). The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill, USA.

Vollmer RT, Humphrey PA, Swanson PE, Wick MR, Hudson M'LA (1998). Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma; its relation to histologic grade and expression of p53, MIB-1, c-erb B-2, epidermal growth factor receptor and bcl-2. *Cancer* **82**: 715-723.

Wang-Gohrke S, Chang-Claude J (2001). Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **93 (21)**: 1657-1658.

Weber BL (2002). Cancer genomics. *Cancer Cell* **1**: 37-47.

Xie D, Shu XO, Deng Z, Wen WQ, Creek KE, Dai Q, Gao YT, Jin F, Zheng W (2000). Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **92 (5)**: 412-7.

Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, Iwase H (2004). Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **6(1)**: R24-30.

Yarden Y (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* **61(2)**: 1-13.

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network (review). *Nature Reviews- Molecular Cell Biology* **2**: 127-137.

Yasasever V, Dincer M, Camlica H, Duranyildiz D, Dalay N (2000). Serum c-erb B2 oncoprotein levels are elevated in recurrent and metastatic breast cancer. *Clin Biochem* **33**: 315-317.

Zhang F, Yang Y, Smith T, Kau SW, McConathy JM, Esteva FJ, Kuerer HM, Symmans WF, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Pusztai L (2002). Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma. *Cancer* **97**: 1758-1765.



ANEXO I – SOLUÇÕES**• PBS**

Na₂HPO₄ 1,48 g/l (Merck 1065860500)

NaH₂PO₄ 0,495 g/l (Merck 63460500)

NaCl 7,2 g/l (Panreac cod131659)

• AKE

NH₄Cl 82,9 g/l (Merck 101146)

KHCO₂ 10 g/l (Merck 48540500)

EDTA 0,37 g/l (Merck 108418)

• SE

NaCl 75mM (Panreac cod131659)

EDTA 25mM (Merck 108418)

ANEXO II

Provas do artigo intitulado "HER2 polymorphism and breast cancer risk in a southern European population", aceite para publicação na revista *European Journal of Cancer Prevention*.

HER2 POLYMORPHISM AND BREAST CANCER RISK IN A SOUTHERN EUROPEAN POPULATION

Daniela Pinto¹, (ScD); André Vasconcelos¹, (MSc); Sandra Costa¹, (MSc); Deolinda Pereira², (MD); Helena Rodrigues², (MD); Carlos Lopes¹, (MD, PhD); Rui Medeiros¹, (PhD).

- 1 Molecular Oncology Unit
- 2 Medical Oncology Department (COIII)

Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional do Porto

Acknowledgments

The authors would like to thank Liga Portuguesa Contra o Cancro – Porto (Portuguese League Against Cancer) for their support. We gratefully acknowledge funding of this work by the Ministry of Health of Portugal (CFICS-226/2001).

Correspondence to:

Rui Medeiros, PhD
Instituto Português de Oncologia
Laboratórios – Piso 4
R. Dr. António Bernardino de Almeida
4200-072 Porto
Portugal
Tel.: 351 22 5502011 (ext.5022)
Fax: 351 22 5026489
e-mail: patpriv@ipporto.min-saude.pt

Summary

Breast cancer is a major public health problem around the world, and its carcinogenesis is not yet well understood. The Human Epidermal growth factor Receptor-2 (HER2) seems to play an important role in the development of this neoplasia, and genetic alterations in this gene, such as point mutations and polymorphisms have been detected in breast cancer patients. We analyzed the frequency of a single nucleotide polymorphism in the *HER2* gene in 152 breast cancer patients and 146 healthy controls using PCR-RFLP. We found a twofold increase in risk of breast cancer in women who are carriers of a Val allele genotype – Ile/Val and Val/Val genotypes (OR = 2.00; 95% CI: 1.23-3.25; p = 0.005). Our results indicate an association between the presence of the Val allele in the *HER2* polymorphism and the risk of breast cancer. Further studies are needed to evaluate the role of this polymorphism in the behavior of breast cancer.

Key words: *HER2* (*ERBB2*, *NEU*), genetic polymorphisms, breast cancer, PCR-RFLP, oncogene, chromosome 17, cancer susceptibility.

Introduction

Breast cancer is a major public health problem around the world. According to the International Agency of Research in Cancer – IARC (Ferlay *et al.*, 2001), the incidence of breast cancer in 2000 was 35,7 per 100000 women, which makes it the commonest malignancy among women.

In the past years several studies have tried to establish a relationship between genetic alterations and the carcinogenesis of this neoplasia. It is now well accepted that breast cancer results from genetic and environmental factors leading to the accumulation of mutations in essential genes (Baselga and Norton, 2002). One of the most important genes studied is the Human Epidermal growth factor Receptor-2 (*HER2*), which has been classified as a potential molecular prognostic indicator, as well as target for therapy, by several groups (Kim *et al.*, 1998; Révillion *et al.*, 1998; Gullick, 2001; Olayioye, 2001; Rogers *et al.*, 2002). Alterations in this gene, such as gene amplification (Yasasever *et al.*,

2000; Tsuda *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2003) and point mutations (Bargmann *et al.*, 1986a) have been observed in breast cancer patients.

The *HER2* is a proto-oncogene located in chromosome 17, and is also known as *ERBB2* or *NEU* (Coussens *et al.*, 1985; Akiyama *et al.*, 1986, Bargmann *et al.*, 1986b). This oncogene encodes a 185 kDa transmembrane glycoprotein, which is a member of the epidermal growth factor receptor (HER) family. The members of this family possess intrinsic tyrosine kinase activity (Hynes, 2000; Stern, 2000), which allows them to play an important role in signal-transduction pathways, regulating many cellular functions, such as cell differentiation and proliferation (Goel *et al.*, 2002). This activation of the signaling pathways results from dimerization of the HER receptors (Eppenberger and Mueller, 1994), and in this context, *HER2* seems to be the preferred heterodimerization partner for all HER members (Sundaresan *et al.*, 1999).

A single nucleotide polymorphism at codon 655 of *HER2* gene was identified by Papewalis and coworkers (Papewalis *et al.*, 1991), and encodes either isoleucine (ATC) or valine (GTC). Controversial reports have been published regarding the role of this polymorphism in the development of breast cancer, in different geographic locations (Ameyaw *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000; Baxter and Campbell, 2001; Keshava C *et al.*, 2001; Wang-Gohrke and Chang-Claude, 2001). However, the role of *HER2* genotypes in the susceptibility to breast cancer has not yet been studied in populations of southern Europe.

Considering that breast cancer is a multifactorial disease with genetic and environmental factors involved in its etiology and that the influence of some factors may differ according to race and geographic localization, we determined *HER2* genotypes in Portuguese breast cancer cases and controls, thereby focusing on a Southern European population.

Materials and Methods

Population

We conducted a case-control study analyzing two hundred and ninety eight (298) women. All participants were Caucasians living in the Porto District.

One hundred and fifty two (152) consecutive unrelated patients with histologically verified breast cancer, admitted at the Portuguese Institute of Oncology – Porto, Portugal

between 2000 and 2002 were studied. All patients included were at time of diagnosis. The median age at diagnosis was 46 years with a mean age of 48 years. Clinical characteristics including tumor stage, histological type and grade were obtained at time of diagnosis and are described in Table 1. 85.2% of all cases were invasive ductal carcinoma and the 62.2% were grade II. As for tumor staging, 51.35% were stage II. All samples were obtained with the informed consent of the participants prior to their inclusion in the study.

Table 1

The control group consisted of one hundred and forty six (146) healthy individuals with no evidence of neoplastic disease, with a median age of 49 years and a mean age of 51 years. This control group was recruited from the Institute's blood donor's bank, or from cancer free women attendants at routine clinical check up.

Approximately 8 ml of venous blood were obtained with a standard venipuncture technique using EDTA containing tubes. DNA was extracted from the white blood cell fraction, from each study subject, using a salting out protocol (Miller *et al.*, 1988).

Analysis of HER2 polymorphism

The *HER2* polymorphism was analyzed through Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), as previously described by Xie *et al* (2000). DNA was amplified in a 50 μ l reaction mixture containing *HER2* primers: F-5'AGA GCG CCA GCC CTC TGA CGT CCA T3' and R-5'TCC GTT TCC TGC AGC AGT CTC CGC A3', PCR buffer 1X, 2.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTP and 1U of *Taq* Polymerase. The PCR steps were as followed: initial melting 30 seconds at 94°C, 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 62°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, with a final extension step at 72°C for 7 min.

The PCR products, of 148 base pairs (bp), were then digested overnight with 1U *BsmAI*. This restriction enzyme recognizes the sequence GTC, originating two fragments of 116 and 32 bp.

The restriction fragments were then analyzed in a 3% agarose gel, stained with ethidium bromide (Fig. 1).

Fig. 1

Statistical analysis

Analysis of data was performed using the computer software SPSS for Windows (Version 10.0) and Epi Info (Version 6.04). Chi-square analysis was used to compare

categorical variables. A 5% level of significance was used in the analysis. The observed number of each genotype was compared with that expected for a population in the Hardy-Weinberg equilibrium using a χ^2 test.

The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) were calculated as a measure of the association between *HER2* genotypes and breast cancer risk. Multivariate logistic regression analysis was used to calculate the adjusted OR and 95% CI for the influence of *HER2* genotypes in risk of breast cancer, with adjustment for age.

We calculated the attributable proportion (AP), according to data previously reported by Schiffman *et al.* (1993), using the following formula: $AP = PRF \times (1 - 1/aOR)$. The attributable proportion (AP) is the fraction of disease attributable to the risk factor; PRF is the percentage of the risk factor in case subjects and aOR is the adjusted odds ratio.

Results

The distribution of *HER2* genotypes among cases and controls and risk of breast cancer due to the *HER2* polymorphism is shown in Table 2. The observed genotype distributions in the groups did not differ from those that would be expected from the Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.902$).

The frequency of the Ile/Val genotype was higher in cases (37.5%) than in controls (23.9%), and the same was observed with the Val/Val genotype (4.6% and 2.8%, respectively). A twofold increase in risk of breast cancer was found among women who are carriers of a Val allele genotype – Ile/Val and Val/Val genotypes (OR = 2.00; 95% CI: 1.23-3.25; $p = 0.005$).

When we stratified the analysis according to median age (women older than 46 vs. women younger than 46) we observed that, for the group of women older than 46 carrying a Val allele genotype, there is a statistically significant threefold increase of breast cancer risk (OR = 3.03; 95% CI: 1.51-6.07; $p=0.002$).

The multivariate logistic regression analysis confirmed the influence of a Val carrier genotype in the risk of breast cancer, with adjustment to age (OR = 2.03; 95% CI: 1.24-3.32; $p = 0.005$).

As for the distribution of alleles, the frequency of Val allele was 23.4% in cases and 14.7% in controls, whereas the frequency of Ile allele was 76.6% in cases and 85.3% in controls. This difference is statistically significant (OR = 1.76; 95% CI 1.14-2.74; $p = 0.007$).

Table 2

A comparison of genotype and allelic frequencies from our control population with reported frequencies from other populations is shown in Table 3. The Val allele frequency observed in our population is 0.15, which is very similar to the frequencies reported by Keshava *et al.* (2001) in Caucasian and Latin women (0.16 and 0.13, respectively).

For the entire case group the proportion of breast cancer cases attributable (attributable proportion) to the Val allele genotypes was 21.1%. Moreover, for patients older than 46 years, 30.3% of all cases could be attributed to the influence of this risk factor.

Discussion

In the last few years, cancer has been seen as a complex, multivariate disease, and particular attention has been given to the genetic basis of tumors. It is now clear that most cancers result from the acquisition of mutations in oncogenes, which are involved in many of the basic functions of a cell (World and Health Organization, 2002).

The oncogene *HER2* plays an important role in the control of normal and differentiation (Yarden, 2001).

In this study we analyzed a single-nucleotide polymorphism in *HER2*, in order to evaluate its importance in the development of breast cancer. We found a twofold increased risk of breast cancer in women who are carriers of a Val allele genotype – Ile/Val and Val/Val genotypes and this association was even stronger in women older than 46, with a threefold increase in breast cancer risk, and an attributable proportion of 30.3%.

The polymorphism studied consisted in the alteration of ATC (Isoleucine) to GTC (Valine) in the transmembrane domain-coding region of the gene. Alterations in the transmembrane segment of the protein may have profound effects on its biological activity and transforming ability (Xie *et al.*, 2000). Therefore, we hypothesize that Val allele genotype may have a biological activity, which enhances its role in the biological mechanisms of cancer development.

Other groups have studied this polymorphism and have reached different conclusions concerning its importance in breast cancer development, depending on their geographic location. When we analyze Table 3 we can see that our results regarding allelic frequencies of normal controls are very similar to the results of Caucasian and Latin populations, obtained by Keshava *et al.* (0.15; 0.16 and 0.13). However, for the English and German populations (North European populations) higher Val allele frequencies (0.26 and 0.23) have been reported (Baxter *et al.*, 2001; Wang-Gohrke *et al.*, 2001).

The etiology of breast cancer cannot be explained by allelic variability at a single locus (Newman *et al.*, 1997; Rebbeck, 1997). Instead, the major burden of breast cancer population probably results from complex interaction between many genetic and environmental factors over time (Coughlin and Piper, 1999). Several genetic polymorphisms contributing to low-to-moderate cancer risk have been studied, regarding its association with breast cancer risk (Ambrosone *et al.*, 1996; Coughlin and Piper, 1999; Vasconcelos *et al.*, 2002; Lillie *et al.*, 2003). Further studies may include the analysis of other genetic polymorphisms (*NAT2*, *CYP2E1*, *GST*, *ecNOS*, *ARStuI*, *VDR*) that have already been associated with cancer risk (Costa *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2002a,b, 2003a,b; Ferreira *et al.*, 2003), in order to characterize the genetic profile of breast cancer susceptibility in Southern European populations.

The contribution of genetic polymorphisms to the risk of breast cancer may be dependent on the population in study, as well as on several environmental and diet factors that influence that population. Therefore, we hypothesize that each population has to evaluate its own genetic profile for cancer risk that may help to understand the geographic and racial differences reported for breast cancer incidence and mortality. Larger-scale molecular studies are needed to confirm the real meaning of *HER2* genetic polymorphisms in breast cancer.

References

- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1986). The product of c-erbB-2 gene: a 185 kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* **232** (4758): 1644-6.
- Ambrosone CB, Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Shields PG (1996). Molecular epidemiology of lung and breast cancer. *Eur J cancer Prev* **5**: 391-2.
- Ameyaw MA, Thornton N and McLeod HL (2000). Re: Population-based, case-control study of *HER2* genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **92** (23): 1947.
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA (1986a). Multiple independent activations of neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* **45**: 649-57.
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA (1986b). The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* **319** (6050): 226-30.
- Baselga J and Norton L (2002). Focus on breast cancer. *Cancer Cell* **1**: 319-22.

Baxter S and Campbell I (2001). Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **93** (7): 557.

Costa S, Medeiros R, Vasconcelos A, Pinto D, Lopes C (2002). A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **128** (12): 678-82.

Coughlin SS and Piper M (1999). Genetic polymorphisms and risk of breast cancer – review. *Cancer Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **8**: 1023-32.

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, *et al.* (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* **230** (4730): 1132-9.

Eppenberger U and Mueller H (1994). Growth factor receptors and their ligands. *J Neuro-Oncol* **22**: 249-54.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2001). GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press.

Ferreira PM, Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Morais A, Oliveira J, Lopes C (2003). Association between CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer. *Eur J cancer Prev* **12** (3): 205-11.

Goel S, Mani S and Perez-Soler R (2002). Tyrosine kinase inhibitors: a clinical perspective. *Current Oncol Reports* **4**: 9-19.

Gullick WJ (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy; alternative strategies for targeting the epidermal growth factor system in cancer (review). *Breast Cancer Res* **3**: 390-4.

Hynes NE (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer (commentary). *Breast Cancer Res* **2**: 154-7.

Keshava C, McCanlies EC, Keshava N, Wolff MS, Weston A (2001). Distribution of *HER2*⁶⁵⁵ genotypes in breast cancer cases and controls in the United States. *Cancer letters* **173** (1): 37-41.

Kim YT, Kim JW and Lee JW (1998). C-erbB-2 oncoprotein assay in ovarian carcinoma and its clinical correlation with prognostic factors. *Cancer Letters* **132**: 91-7.

Lillie EO, Bernstein L, Ursin G (2003). The role of androgens and polymorphisms in the androgen receptor in the epidemiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **5** (3): 164-73.

Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Lopes C (2002a). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* **11** (4): 343-50.

Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Lopes C (2002b). The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility to prostate cancer of a southern European population. *J Hum Genet* **47** (8): 413-8.

Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Ferreira P, Lobo F, Morais A, Oliveira J, Lopes C (2003a). Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3 and GSTT1 genetic polymorphisms. *Prostate* (in press).

Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Morais A, Oliveira J, Lopes C (2003b). Steroid hormone genotypes ARStuI and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **141** (2): 91-6.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.

Müller V, Thomssen C, Karakas C, Eustermann I, Ramirez Porras J, Coith C, Berger J, Loning T, Janicke F, Pantel K (2003). Quantitative assessment of HER-2/neu protein concentration in breast cancer by enzyme-linked immunosorbent. *Int J Biol Markers* **18** (1): 13-20.

Newman B, Millikan RC and King MC (1997). Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. *Epidemiol Rev.* **19**: 69-79.

Olayioye MA (2001). Update on HER2 as a target for cancer therapy; intracellular signalling pathways of ErbB2/HER-2 and family members (Review). *Breast Cancer Res* **3**: 385-9.

Papewalis J, Nikitin Ayu, Rajewsky MF (1991). G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic Acids Res* **19** (19): 5452.

Rebbeck TR (1997). Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **6**: 733-43.

Révillion F, bonnetterre J and Peyrat JP (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance (Review). *Eur J Cancer* **34** (6): 791-808.

Rogers CE, Loveday RL, Drew PJ *et al.* (2002). Molecular prognostic indicators in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* **28**: 467-78.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stantor CK, Manos MM (1993). Epidemiologic evidence showing that Human Papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **85**: 958-64.

Stern DF (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer; erbB family receptor tyrosine kinases (review). *Breast Cancer Res* **2**: 176-83.

Sundaresan S, Penuel E and Sliwkowski M (1999). The biology of human epidermal growth factor receptor 2. *Current Oncol Reports* **1**: 16-22.

Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, *et al* (2001). Detection of HER-2/*neu* (C-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. *Cancer* **92**: 2965-74.

Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, Pereira D, Carrilho S, Palmeira C, Azevedo C, Lopes CS (2002). Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Breast J.* **8** (4): 226-9.

Wang-Gohrke S and Chang-Claude J (2001). Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **93** (21): 1658.

World Health Organization (2002). *Genomics and World health – report of the advisory committee on health research*. World Health Organization, Geneva.

Xie D, Shu XO, Deng Z, Wen WQ, Creek KE, Dai Q, Gao YT, Jin F, Zheng W (2000). Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **92** (5): 412-7.

Yarden Y (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* **61** (2): 1-13.

Yasasever V, Dincer M, Camlica H *et al.* (2000). Serum c-erb B2 oncoprotein levels are elevated in recurrent and metastatic breast cancer. *Clin Biochemistry* **33** (6): 315-7.

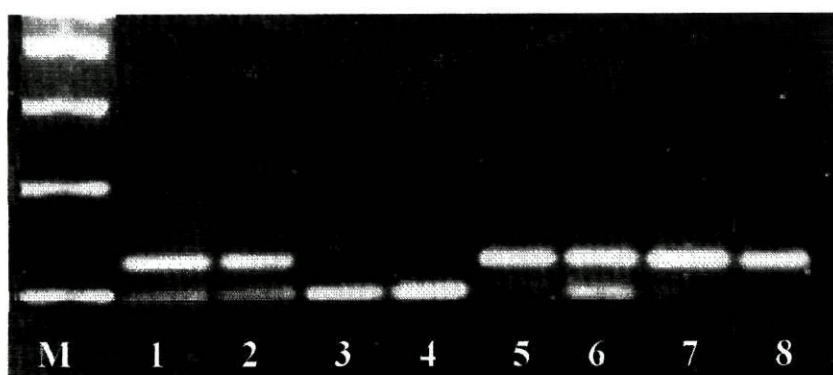


Figure 1. Analysis of the *HER2* genotypes – restriction fragment length polymorphism of the PCR products. M – 100 bp ladder; cases 1,2 and 6 – *HER2* heterozygous (Ile/Val); cases 3 and 4 – homozygous Val/Val; case 5 – homozygous Ile/Ile.

Table 1. Tumor characteristics of patients with breast cancer.

	No. of patients	Percent
Histology		
Ductal invasive	121	79.6
Intraductal	5	3.3
Medullary	3	2.0
Papillary	2	1.3
Mucinous	2	1.3
Metaplastic invasive	1	0.7
Lobular invasive	8	5.3
Unknown	10	6.6
Grading		
I	13	8.6
II	79	52.0
III	35	23.0
Unknown	25	16.4
Staging		
0	3	2.0
I	33	21.7
II	84	55.3
III	16	10.5
IV	1	0.6
Unknown	15	9.9

Table 2. Distribution of *HER2* genotypes among cases and controls.

Genotypes	Cases (n=152)		Controls (n=146)		p	O.R.	95% CI
	n	%	n	%			
Ile/Ile	88	57.9	107	73.3			
Ile/Val	57	37.5	35	23.9			
Val/Val	7	4.6	4	2.8			
Ile/Ile	88	57.9	107	73.3		1.00	reference
Val carrier	64	42.1	39	26.7	0.005	2.00	1.23-3.25
Age ≤46							
Ile/Ile	46	59.7	39	66.1		1.00	reference
Val carrier	31	40.3	20	33.9	0.448	1.31	0.65-2.66
Age >46							
Ile/Ile	40	54.8	66	78.6		1.00	reference
Val carrier	33	45.2	18	21.4	0.002	3.03	1.51-6.07

O.R. - odds ratio; CI - Confidence interval.

Table 3. Comparison of the genotype and allelic frequencies between different populations.

	Number of individuals	Genotypes frequency			Allelic frequency		
		Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Ile	Val	
Portugal	Our study, 2003	146	0.732	0.239	0.028	0.85	0.15
Caucasian, NY	Keshava <i>et al.</i> , 2001	180	0.717	0.244	0.039	0.84	0.16
Latin, NY	Keshava <i>et al.</i> , 2001	77	0.753	0.234	0.013	0.87	0.13
Chinese	Xie <i>et al.</i> , 2000	359	0.780	0.217	0.003	0.89	0.11
Caucasians	Ameyaw <i>et al.</i> , 2000	257	0.654	0.292	0.054	0.80	0.20
English	Baxter <i>et al.</i> , 2001	256	0.539	0.394	0.066	0.74	0.26
German	Wang-Gohrke <i>et al.</i> , 2001	1078	0.599	0.347	0.054	0.77	0.23