



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* E *COMT* E AS LESÕES GENÔMICAS ESPONTÂNEAS EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Raquel Alves dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Genética.

RIBEIRÃO PRETO
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Raquel Alves

POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* E COME AS
LESÕES GENÔMICAS ESPONTÂNEAS EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA.

Ribeirão Preto, 2007.

140pp. 28cm

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP
Departamento de Genética.

Orientadora: Takahashi, Catarina Satie

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho bem como a sua apresentação em diversos congressos foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- ❖ Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Proc. Nº 473493/2004-7 e 400887/2005-3).
- ❖ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- ❖ Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA.
- ❖ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- ❖ Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.
- ❖ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- ❖ Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental – SBMCTA.
- ❖ Environmental Mutagen Society.

Agradeço especialmente,

A Deus, que na sua graça infinita ilumina meu caminhar e me dá o privilégio de aprender coisas tão belas, na ciência e no amor, revelando assim Sua grandiosidade e perfeição.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus.

Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem

Dedico,

Aos meus pais queridos Mário e Virgínia,

Qualquer palavra de gratidão seria pequena demais diante da generosidade que brota desses corações! Agradeço por terem me ensinado com imensa grandiosidade, simplicidade, ternura e muito amor que “o essencial é invisível aos olhos” e que por isso consigo ser feliz! Obrigada por me aceitarem como sou, por respeitarem a minha liberdade e minhas escolhas, por terem me dado as asas com as quais posso voar e por serem o colo quentinho, o melhor aconchego que conheço, enfim.....por serem PAPAI e MAMÃE. Amo vocês!!!!!!!!!!!!

À minha orientadora Profa Catarina,

Pela imensa alegria no convívio ao longo desses tantos anos, pelo carinho e dedicação que teve ao me orientar nesse trabalho e em tantas outras realizações. Agradeço a simpatia com a qual me recebeu em seu grupo, o cuidado que teve com minha formação, os bons conselhos que levarei para sempre e o exemplo de conduta que desejo seguir. Espero levar aos que virão após mim todos esses aprendizados! Tenho absoluta certeza de que sentirei muitas saudades do alegre convívio diário!

Esse trabalho de doutorado trouxe muitas alegrias de todas as formas possíveis! Escolher esse tema para minha tese foi uma decisão muito bem pensada que levou em consideração minhas aptidões pessoais, a equipe médica que estaria envolvida, e principalmente a minha vontade imensa de conviver com as pacientes e assim sair um pouquinho da dedicação exclusiva ao laboratório. Que decisão acertada!!!! Durante esses anos eu tive a chance de conhecer histórias incríveis que me fizeram chorar, que esquentaram o meu coração, que me fizeram ver a vida como um momento singular e muito precioso e que me fizeram entender com mais serenidade a morte. Minhas coletas eram feitas num momento muito delicado: assim que a paciente recebia o diagnóstico de sua doença. Acompanhei muitas mulheres ao longo do tratamento e vi as transformações que sofriam por conta do mesmo. Muitas venceram, outras sobreviveram e houve aquelas que tiveram que fechar os olhos definitivamente como a única forma de descanso. Independentemente do desfecho de cada história, todas elas deixaram um pouco de si em mim, ensinaram-me muito sobre superação, otimismo e fé. Sem saberem, acredito que de alguma forma elas contribuíram para que eu me tornasse alguém melhor!!!!

AGRADEÇO IMENSAMENTE A TODAS AS DOADORAS.

Agradecimentos

À minha orientadora **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi**, pelas oportunidades em seu laboratório e fora dele, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela parceria e por colaborar de modo tão importante com minha formação pessoal e profissional.

À **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, pela amizade, carinho e apoio presentes no nosso agradável convívio no laboratório. Por ter contribuído de modo tão importante para a minha formação e por toda generosidade dispensada a mim ao longo desses anos. Nunca vou esquecer todo incentivo e ajuda que recebi nos momentos mais delicados desse tempo bom!

Ao **Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade**, pela simpatia e disposição com as quais abraçou esse trabalho quando ainda era um projeto de pesquisa, pela admirável competência profissional e preciosa ajuda na execução deste trabalho, sem a qual não haveria possibilidade de ser concretizado.

Ao **Prof. Dr. Hélio H. A. Carrara**, pela simpatia e carinho com os quais me recebeu, pela paciência em ajudar nas coletas de sangue das pacientes, apoio nas vitórias que conquistamos, por todas as aulas brilhantes nos corredores do ambulatório e pela gentil e tão preciosa colaboração na realização desse trabalho.

À **Profa. Dra. Nilce Martinez Rossi**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP, por toda atenção dispensada ao longo desses anos de pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP, pela atenção e apoio dispensados sempre, pela dedicação incansável em promover o crescimento e a qualidade do curso, mas principalmente pelo carinho, incentivo e apoio dispensados durante esse tempo.

À **Profa. Dra. Lúcia Martelli**, ex-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética da FMRP-USP tão empenhada na luta pela qualidade do nosso curso, por quem tenho um enorme carinho, agradeço toda atenção, apoio, oportunidades e os ensinamentos tão preciosos sobre administração e gerenciamento de recursos.

À **Dra Christiane Pienna Soares**, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, profissional admirável que tive o privilégio de conhecer. Agradeço o carinho, a amizade, o apoio, mas principalmente as portas abertas, onde pude descobrir a responsabilidade e o prazer de ser mestre.

À **Dra Lusânia Maria M. G. Antunes**, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, exemplo de perseverança e competência profissional, agradeço as oportunidades, toda ajuda dispensada e os ensinamentos sempre tão preciosos.

Ao **Dr Rommel Rodriguez Burbano**, docente do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Pará pela amizade e pelas inúmeras oportunidades que contribuíram de modo tão importante para a minha formação.

Aos **Membros da Banca Examinadora**, por sua disposição e paciência em analisar este trabalho e trazer contribuições preciosas para a sua finalização.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana R. P. Nalon** e **Maria Aparecida O. S. Elias** pela ajuda, atenção, por toda paciência que têm comigo, mas principalmente pela amizade tão preciosa que desenvolvemos.

Às enfermeiras e auxiliares-administrativo do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, **Ana Lúcia, Margarida, Élika, Márcia, Leuda, Tânia, Ângela, Maria Helena, Rita, Fabiana, Alaíde, Cida, Sílvia, Irma, Fátima** e **Lucimar**, por toda ajuda imprescindível, atenção, mas principalmente pelo carinho e amizade que construímos durante o tempo das coletas. Vocês foram, como sempre: MARAVILHOSAS!!!!!!

Aos médicos do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, **Dr Willian Simões, Dr Renato, Dr Alexandre, Dr Rodrigo, Dr Franklin, Dr Vitor, Dr Luis Gustavo, Dra Stefânia, Dra Viviane, Dr Fábio, Dr Joaquim, Dr Philbert, Dr Heitor, Dra Fernanda** pela ajuda preciosa na coleta das amostras.

Ao **Dr Ângelo Mathes** e sua esposa **Heloísa Mathes**, por toda ajuda nas coletas, pela amizade construída e pelas conversas sempre tão agradáveis.

À minha querida **Sueli Aparecida Neves**, técnica do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, pela amizade e grande ajuda ao longo desses anos, pelas incontáveis horas de muitas risadas.

Ao querido **Luiz Augusto da Costa Júnior**, o “Juca”, técnico do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, pela ajuda prestada, mas principalmente, pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

À **Mônica Beatriz Mayorano**, companheira de coletas, pela ajuda, amizade, inúmeros presentinhos trazidos da Argentina e pelo carinho durante esse tempo de convívio.

À **Ana Cláudia Teixeira**, minha “pupila” querida, com quem cultivei a responsabilidade de ensinar, pela amizade, apoio, grande ajuda com meu trabalho e pelo carinho incondicional.

À **Aline Poersch** por toda ajuda durante a finalização das coletas para esse trabalho, ah.... e pelos deliciosos doces trazidos do sul que tanto atrapalham minhas tentativas de dieta!

À querida **Ana Paula Montaldi**, por toda ajuda que recebi ao longo dos anos de convívio, por ser sempre tão solícita e disposta a ajudar todos em qualquer momento.....essa qualidade é rara e preciosa!

À **Dra Carmen Lúcia Bassi**, amiga querida de tantos anos, agradeço muito a ajuda no laboratório e fora dele, o carinho e amizade incondicionais e o apoio nos momentos bons e nem tão bons desse tempo que passou, agradeço por ter sido a irmã escolhida para essa caminhada que fazemos juntas.

Ao **Dr Stephano Spanó Mello**, colega querido e tão solícito durante todo o tempo de convívio. Agradeço as preciosas dicas e ajudas, a amizade tranqüila e grandes risadas proporcionadas nos momentos de muita abstração criativa (que o diga o MOB!).

Ao **Dr Renato de Souza Cardoso**, grande cientista, admirável pela competência, que tanto contribuiu para a minha formação. Agradeço muito os ensinamentos, as conversas e o espelho de bom exemplo que se tornou para mim.

Às **Dras Gilmara Ausech Antonucci e Marjori Leiva Camparoto** por toda ajuda no tempo em que ainda eram pós-graduandas. Agradeço a amizade e boas risadas durante o convívio.

Aos “meninos” **Igor (Primal), Douglas (Biscuit), Danilo (Xitão), Danillo (Bollor), Paulo (Cop), Gustavo (Polvilho), Léo, Cristiano (Profeta) e Vinícius**, por toda a alegria de convívio diário, leveza nas brincadeiras, pelas gargalhadas que me fazem tão bem! Sinto-me privilegiada por ter vocês como companheiros de trabalho!

Às “meninas” **Cássia, Cleide, Carla, Patrícia, Giovana, Fátia, Juliana e Maria Sol**.....pela ajuda recebida, pela amizade e por compartilharem os momentos “mulherzinha” de grande descontração.

Ao meu querido **Fábio**, por todo apoio, ajuda e carinho durante o tempo em que compartilhamos momentos importantes da nossa caminhada juntos.....mas principalmente pela amizade que perdura!

Aos meus queridos e eternos amigos **Plínio, Marcelo e Verônica** junto com os pequenos **Marcos, Tereza e Carolina**, por toda amizade sincera, carinho e apoio e por terem sido parte da minha família nesse tempo de doutorado. Vocês estarão eternamente guardados em meu coração!!!!

Aos meus amigos paraenses **Giovanny, Keiko, Léo, Fábio Motta e Ciane**, com quem compartilhei muitas alegrias e com quem muito aprendi sobre os hábitos e a cultura paraense, o que me tornou uma filha “adotiva” dessa terra.

Aos colegas do laboratório de Bioinformática **Gabriela, Breve, Daniel, Luciano, Renato e Saulo** pelo carinho, pela amizade saudável e por toda ajuda. Vocês são incríveis!!!!!!!

Há tantas pessoas a quem devo agradecer, mas como seria muito difícil citar todas, uma a uma, fica aqui a minha eterna gratidão àqueles que direta ou indiretamente ajudaram-me a escrever parte dessa história!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer de mama: aspectos gerais e fatores de risco.....	1
1.2 Genes envolvidos na biossíntese e metabolização do estradiol.....	3
1.3 Mutagênese, carcinogênese e a importância dos biomarcadores de efeito e de suscetibilidade.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Casuística.....	11
3.2 Técnicas Citogenéticas.....	12
3.2.1 Teste do micronúcleo em linfócitos do sangue periférico.....	12
3.2.2 Ensaio Cometa.....	14
3.2.3 Ensaio Cometa para detecção de danos oxidativos.....	15
3.3 Técnicas Moleculares.....	16
3.3.1 Extração de DNA Genômico.....	16
3.3.2 Quantificação do DNA.....	16
3.3.3 Amplificação das seqüências de DNA por PCR.....	17
3.3.4 Detecção dos polimorfismos por PCR-RFLP.....	19
3.4 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS	24
4.1 Caracterização geral da amostra de pacientes com câncer de mama e controles estudados.....	24
4.2 Análise da extensão dos níveis basais de lesões no DNA detectadas pelo teste do micronúcleo e pelo Ensaio Cometa.....	28
4.3 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes <i>CYP17</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>COMT</i> em pacientes com câncer de mama e controles.....	36
4.4 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes <i>CYP17</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>COMT</i> em pacientes com CM e controles em relação à etnia.....	43

4.5 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes <i>CYP17</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>COMT</i> em pacientes com CM e controles de acordo com o hábito tabagista.....	49
4.6 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes <i>CYP17</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>COMT</i> em pacientes com CM e controles saudáveis de acordo com a idade da menarca e da menopausa.....	52
4.7 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes <i>CYP17</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>COMT</i> de acordo com os diferentes marcadores tumorais obtidos no grupo de mulheres com CM.....	63
4.8 Análise da extensão dos níveis basais de lesões no DNA detectada pelo teste do micronúcleo e pelo Ensaio Cometa de acordo com os diferentes polimorfismos analisados nos genes <i>CYP17</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>COMT</i>	66
5. DISCUSSÃO.....	77
5.1 As lesões genômicas espontâneas detectadas em mulheres com CM e mulheres sadias.....	78
5.2 Os polimorfismos genéticos relacionados às enzimas envolvidas nas etapas de biossíntese e metabolização de estrógenos.....	84
5.3 Relação entre os polimorfismos genéticos relacionados às enzimas envolvidas nas etapas de biossíntese e metabolização de estrógenos e as lesões genômicas detectadas em mulheres com CM.....	97
6. CONCLUSÕES.....	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
MANUSCRITO.....	119
ANEXOS.....	137
Anexo A.....	137
Anexo B.....	138
Anexo C.....	139

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the second most frequent kind of cancer in worldwide and the most common malignant disease among women. Although cancer is considered a typical aging disease, BC is presenting some distinctive features concerning age-specific incidence rates. Risk factors for breast cancer include early age of menarche and late menopause, hormonal therapies, exposure to environmental pollutants, smoking and alcohol habits, however, increased or prolonged estrogen exposure is the most important risk factor. Estrogen biosynthesis and metabolism requires a great number of enzymatic pathways regulated by different genes with polymorphisms that has been described in association with BC and is well known that estrogens can damage the DNA by increasing the formation of DNA adducts and by inducing 8-hydroxylation of purine bases and breaks in DNA strand. Thus, the aim of the present work was to investigate the levels of DNA damage in BC patients prior chemotherapy or radiotherapy, the possible association of the estrogen metabolizing genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* and *COMT* polymorphisms on breast cancer risk and also the possible influence of these polymorphisms on the spontaneous levels of DNA damage. Micronucleus test and Comet assay was performed to detect spontaneous DNA damage, using peripheral blood lymphocytes from 45 women diagnosed for Ductal “*in situ*” or invasive breast carcinoma and 85 healthy control women. The results showed that the micronucleus (MNs) frequencies and DNA damage detected by Comet assay were significantly higher in BC group than in controls. The levels of DNA damage were similar in smokers and non-smokers and aging did not influence the frequencies of MNs observed BC patients and in controls. For molecular approach the casuistic comprised of 131 healthy control women and 104 women also diagnosed for Ductal “*in situ*” or invasive breast carcinoma. Comparison of the occurrence of the polymorphisms in *CYP17*, *CYP1A1* and *COMT* was not statistically different between patients and controls. However, the risk for BC is three-fold increased in non-smokers Leu/Leu group for *CYP1B1* ($P = 0,04$, OR = 3;

95% confidence intervals: 1,1-8,2). The polymorphisms studied in the above mentioned genes did not influence the age of menarche or menopause differently in BC and controls. The influence of *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* and *COMT* polymorphisms on the levels of DNA damage was also analyzed and while *CYP17* and *CYP1A1* did not affect the MNs frequencies or the DNA damage observed by Comet assay in neither in BC nor in control group, the Leu allele of *CYP1B1* was significantly associated with the higher levels of DNA damage in control group, but did not interfere on DNA damage detected in BC group. On the other hand in the control group, individuals carrying the Met allele of *COMT* exhibited lower levels of DNA damage when compared to wild type homozygous, but in BC group the polymorphic homozygous individuals (Met/Met) presented higher levels of DNA than their wild type homozygous or heterozygous counterparts. In conclusion, the present work demonstrated that BC women present an important genomic instability and suggests that estrogens metabolizing polymorphisms may modify the levels of DNA damage in healthy and in BC women.

RESUMO

O Câncer de Mama (CM) é o segundo tipo mais freqüente de câncer no mundo e a doença maligna mais comum entre as mulheres. Apesar do câncer ser considerado uma típica doença do envelhecimento, o CM apresenta algumas características distintas no que diz respeito às taxas de incidência. Os fatores de risco para o CM incluem idade da menarca precoce e menopausa tardia, terapias hormonais, exposição aos poluentes ambientais, tabagismo e etilismo, no entanto, a exposição prolongada aos estrógenos representa o fator de risco mais importante. A biossíntese e a metabolização dos estrógenos requerem um grande número de vias que são reguladas por uma série de genes cujos polimorfismos têm sido descritos em associação com o CM. Também se sabe que os estrógenos podem danificar a molécula de DNA por aumentar a formação de aductos ou ainda por induzir a 8-hidroxilação de purinas e as quebras de fita simples e duplas do DNA. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os níveis de danos no DNA de pacientes com CM antes da quimioterapia ou da radioterapia, a possível associação entre os polimorfismos dos genes metabolizadores de estrógeno *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* and *COMT* e o risco ao CM e também a possível influência desses polimorfismos nos níveis espontâneos de danos no DNA. Os linfócitos do sangue periférico de 45 mulheres com diagnóstico para Carcinoma Ductal "*in situ*" ou invasor e 85 mulheres sadias (controles) foram utilizados para avaliação de danos espontâneos no DNA pelo teste do micronúcleo e Ensaio Cometa. Os resultados mostraram que as freqüências de micronúcleos (MNs) e os danos no DNA detectados pelo Ensaio Cometa foram significativamente maiores no grupo de pacientes do CM do que no grupo controle. Os níveis de danos no DNA foram similares entre fumantes e não-fumantes e a idade não influenciou as freqüências de MNs observadas em pacientes com CM e controles. Para a abordagem molecular a casuística foi de 131 mulheres controles saudáveis e 104 mulheres também com diagnóstico para Carcinoma ductal "*in situ*" ou invasor. A comparação da ocorrência dos

polimorfismos estudados nos genes *CYP17*, *CYP1A1* e *COMT* não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles. Contudo, o genótipo Leu/Leu para o gene *CYP1B1* aumentou em três vezes o risco para o CM entre não-fumantes ($P = 0,04$, $OR = 3$; 95% intervalo de confiança: 1,1-8,2). Os polimorfismos estudados nos genes citados acima não tiveram associação com a idade da menarca ou da menopausa em pacientes com CM e controles. A possível associação dos polimorfismos nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* sobre os níveis de danos no DNA também foi avaliada e, enquanto o *CYP17* e *CYP1A1* não afetaram as freqüências de MNs ou os danos no DNA observados pelo Ensaio Cometa nem em pacientes com CM nem no grupo controle, o alelo Leu do *CYP1B1* esteve significativamente associado com altos níveis de danos no DNA do grupo controle, mas não interferiu nos danos do DNA detectados no grupo com CM. Em contrapartida, no grupo controle, o indivíduos portadores do alelo Met do gene *COMT* exibiram níveis mais baixos de danos no DNA quando comparados com o homocigoto selvagem, mas no grupo com CM os indivíduos polimórficos homocigotos (Met/Met) apresentaram níveis de danos no DNA mais elevados do que os seu correspondentes homocigotos selvagens e heterocigotos. Concluindo, este trabalho demonstrou que mulheres com CM apresentam uma instabilidade genômica importante e sugere que os polimorfismos nos genes metabolizadores de estrógenos podem modificar os níveis de danos no DNA tanto em mulheres sadias quanto em mulheres com CM.

1. Introdução

1.1 Câncer de mama: aspectos gerais e fatores de risco

O câncer, assim como muitas outras doenças, possui uma etiologia ligada aos componentes genéticos e ambientais e a importância relativa de cada um desses componentes varia de uma neoplasia para outra. Em adição, a relação entre genes e ambiente varia não apenas entre indivíduos que possuem uma mesma malignidade, mas também varia ao longo da vida de um mesmo indivíduo (Wild *et al.*, 2002). Exceto para as neoplasias da infância, o câncer pode ser considerado uma doença relacionada ao envelhecimento, contudo, o câncer de mama (CM) mostra alguns aspectos diferentes em relação às frequências de incidência idade-específicas que, no caso específico deste tipo de tumor, são mais precoces uma vez que a mama é um tecido de resposta aos hormônios ovarianos que são ativos da puberdade à menopausa (Hulka e Moorman, 2001).

O CM é o tipo de tumor mais prevalente entre mulheres de países industrializados (Mirtrunen e Hirvonen, 2003). O mesmo acontece no Brasil sendo que a maior incidência está presente na região Sudeste, estimando-se aproximadamente 73 novos casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2006). Sabe-se também que esse é o tipo de câncer que mais causa mortes entre as mulheres.

Os fatores de risco associados ao início e desenvolvimento de um tumor de mama incluem a idade menarca precoce, idade tardia para a menopausa, a predisposição genética herdada, a exposição aos estrógenos pelo uso de contraceptivos e pela terapia de reposição hormonal, o índice de massa corporal e a exposição aos agentes ambientais como a poluição causada pelo desenvolvimento industrial, o hábito de fumar e o consumo de álcool (Kristensen e Børresen-Dale, 2000; Hulka e Moorman, 2001; Kang *et al.*, 2002).

Entre todos os fatores de risco acima citados, a história familiar é o mais bem estabelecido, uma vez que uma mulher com a mãe ou uma irmã com CM apresenta de uma a

duas vezes mais risco de desenvolver essa doença (Hulka e Moorman, 2001). Os fatores hereditários são observados em um quarto dos casos de CM, no entanto as mutações em linhagens germinativas dos ditos genes de suscetibilidade de alta penetrância, como o *BRCA1* e o *BRCA2*, estão presentes em apenas 5% das afetadas por este tipo de tumor (Easton *et al.*, 1993; Oesterreich e Fuqua, 1999; Lichtenstein *et al.*, 2000).

Sendo assim, os denominados genes de baixa penetrância, que atuam junto com o estilo de vida e com os fatores endógenos, são igualmente responsáveis por grande parte dos casos de câncer e provavelmente têm sua ação associada a alguns genes de alta penetrância ainda não identificados (Johnson-Thompson e Guthrie, 2000). Com relação a esses genes, os candidatos mais importantes dizem respeito àqueles que medeiam uma gama de funções como os genes de reparo do DNA, os de metabolismo de esteróides, os de controle do ciclo celular e os de transdução de sinais (Weber e Nathanson, 2000).

Apesar de ainda não ter precisamente definida a função dos estrógenos na iniciação e progressão do CM, aceita-se que o risco ao desenvolvimento desse tipo de tumor possa estar diretamente relacionado com o tempo de exposição a esses hormônios (Bianco *et al.*, 2003). O que se sabe é que os estrógenos podem induzir alguns danos genéticos importantes como: i) a ligação covalente direta dos seus metabólitos ao DNA; ii) o aumento dos aductos de DNA; iii) a geração de radicais livres pelo ciclo redox de metabolização entre as formas quinona e hidroxiquinona dos estrógenos com conseqüente dano ao DNA como a quebra de fita simples e/ou dupla; iv) a 8-hidroxilação das bases púricas e v) a modificação do DNA mediada pela hidroxiperoxidação lipídica (Roy e Liehr, 1999). Outra hipótese para a atuação dos estrógenos como um fator de risco ao CM é que esses hormônios atuam na proliferação do epitélio do tecido mamário, podendo promover a progressão do CM pelo estímulo da proliferação de células malignas (Folkerd *et al.*, 2006).

Tem sido observada uma considerável variabilidade interindividual com relação ao metabolismo de carcinógenos bem como à biossíntese e metabolização de hormônios

esteróides; essas diferenças interpessoais atribuídas aos polimorfismos genéticos daqueles genes que codificam enzimas metabolizadoras de xenobióticos definem sub-populações de mulheres com um elevado tempo de exposição aos estrógenos e seus metabólitos e a outros tipos de carcinógenos (Dunning *et al.*, 1999).

1.2 Genes envolvidos na biossíntese e metabolização do estradiol

O estradiol é um hormônio pleiotrópico devido às suas propriedades de atuar como fator de transcrição nuclear para uma série de genes diferentes (Huber *et al.*, 2002). A biossíntese de estradiol a partir da cadeia de colesterol envolve uma série de passos controlados por diferentes enzimas. Os genes que codificam essas enzimas foram clonados e as variações genéticas presentes em muitos deles estão sendo identificadas (Kristensen e Børresen-Dale, 2000). Os genes *CYP11A*, *CYP17* e *CYP19* são particularmente importantes. A clivagem da cadeia de colesterol pela enzima codificada pelo *CYP11A* é um passo limitante para a formação dos demais esteróides como a pregnenolona e a progesterona. A hidroxilação e posterior clivagem desses subprodutos pelo *CYP17* leva à formação da androstenediona e dehidroepiandrosterona (DHEA) que são finalmente catalisados pelo *CYP19* para a formação dos andrógenos e do estradiol (Mitrunen e Hirvonen, 2003) (Figura 1).

A subsequente metabolização da cadeia de estradiol inclui um metabolismo oxidativo importante e dirigido por uma série de CYPs. Essa metabolização acarreta a geração de grupos hidroxil em diferentes regiões da molécula afetando suas propriedades biológicas como formação de metabólitos estrogênicos, não-estrogênicos e mesmo carcinogênicos (Mitrunen e Hirvonen, 2003) (Figuras 2 e 3).

O *CYP17*, localizado no braço longo do cromossomo 10 codifica uma enzima de fundamental importância para a síntese de estradiol. Essa enzima medeia a hidroxilação da pregnenolona e da progesterona cujos sub-produtos são também por ela metabolizados e convertidos em DHEA e androstenediona, sendo essa última, o maior precursor de estradiol. Sendo assim, a

atividade do *CYP17* possui um efeito profundo na biodisponibilidade do estradiol, sendo um gene “*gatekeeper*” do metabolismo esteróide, determinado as quantidades disponíveis de pregnenolona/progesterona que serão convertidas em andrógenos ou em estrógenos (Kristensen e Børresen-Dale, 2000; Huber *et al.*, 2002).

A região 5' não-traduzida do *CYP17* pode conter uma substituição de base única T→C na posição 1931 que cria um sítio de ligação putativo (CCACC box) para fator de transcrição Sp-1, equivalente a um promotor adicional 34pb acima do sítio de transcrição de origem (Carey *et al.*, 1994). Dessa forma, o alelo variante^{1931C} (A2) do *CYP17* pode influenciar significativamente a biodisponibilidade de estradiol, aumentando conseqüentemente o risco ao de desenvolvimento de CM (Huber *et al.*, 2002). No entanto os estudos realizados com esse gene apresentam resultados controversos. O achado mais consistente diz respeito ao menor risco de desenvolvimento do câncer de mama em mulheres com idade menarca tardia associada ao genótipo A1/A1 (Feigelson *et al.*, 1997; Haiman *et al.*, 1999) que confere então uma menor exposição ao estradiol.

Em alguns tipos celulares, incluindo células normais e cancerosas na mama, o estradiol pode ser oxidado a hidroxi-catecolestradiol e posteriormente oxidado às formas quinona e semiquinona por enzimas extra-hepáticas do citocromo P450 (principalmente *CYP1A1* e *CYP1B1*) (Spink *et al.*, 1998; Zhu e Conney, 1998). Esse metabolismo é potencialmente perigoso uma vez que a quinona associada ao catecolestradiol pode ligar-se ao DNA formando aductos (Bianco *et al.*, 2003). Além do mais, o ciclo redox entre a quinona e a semiquinona instável causa a formação de radicais hidroxil que podem produzir nucleotídeos de bases hidroxiladas como a 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG) e mutações permanentes, caso essa alteração não seja eficientemente reparada (Liehr, 1997; Liehr, 2000).

O gene *CYP1A1* está envolvido na metabolização do estradiol pela catalização da hidroxilação do carbono 2 (C-2) formando assim o 2-hidroxi-estradiol. É possível que alguns polimorfismos genéticos afetem a atividade enzimática do *CYP1A1* e assim modulem o risco ao

CM (Miyoshi e Noguchi, 2003). Dois deles levam a um aumento da atividade enzimática e de até três vezes mais na taxa de ativação carcinogênica (Landi *et al.*, 1994). Um desses polimorfismos é uma troca de aminoácido de uma isoleucina para uma valina no códon 432 afetando assim a região de ligação heme da enzima e o outro é uma transição T→C na posição 6235 da região 3' não-codificante do gene (Miyoshi e Noguchi, 2003).

O gene *CYP1B1* está localizado no braço curto do cromossomo 2 e catalisa a hidroxilação do carbono 4 (C-4) do estradiol produzindo assim o 4-hidroxi-estradiol, um catecolestrógeno com atividade carcinogênica demonstrada em modelos animais (Zheng *et al.*, 2000). O éxon 3 desse gene codifica o domínio de ligação heme da enzima; uma transversão G→C no éxon 3 resulta na substituição de uma valina (GTG) para uma leucina (CTG) no códon 432 (*Val*⁴³²*Leu*) e esse polimorfismo parece ter um impacto profundo nas propriedades catalíticas do *CYP1B1* uma vez que a atividade 4-hidroxilase do alelo polimórfico exibe uma atividade três vezes maior quando comparado ao alelo selvagem (Tang *et al.*, 1996; Stoilov *et al.*, 1998; Hanna *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000).

Por fim, o 2- e 4-hidroxi-estradiol são posteriormente metilados por uma *O*-metililação catalisada pelo catecol-*O*-metil-transferase, enzima expressa pelo gene *COMT*. Uma simples substituição de base no códon 108/158 na proteína citosólica ou ligada à membrana resulta na troca de uma valina por uma metionina e gera o alelo *Val*¹⁵⁸*Met* (COMT-L), com atividade enzimática de três a quatro vezes menor do que o alelo selvagem *Val* (COMT-H) (Mitrunen e Hirvonen, 2003; Miyoshi e Noguchi, 2003). Dessa forma acredita-se que a atividade reduzida do *COMT* pode aumentar o risco de cânceres hormônio-dependentes pela acumulação de catecolestrógenos e subseqüentes danos oxidativos ao DNA (Huber *et al.*, 2002). A relação entre a freqüência do alelo COMT-L e a suscetibilidade ao CM parece estar relacionada ao estado pré ou pós-menopausa das populações de mulheres estudadas, entretanto a literatura apresenta dados bastante conflitantes (Thompson *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999). Esses achados controversos também fundamentam a idéia de que o a etiologia do câncer de mama

difere biologicamente entre mulheres na pré ou pós menopausa e que o impacto dos alelos variantes do gene *COMT* são modulados por fatores ainda não muito bem compreendidos (Huber *et al.*, 2002).

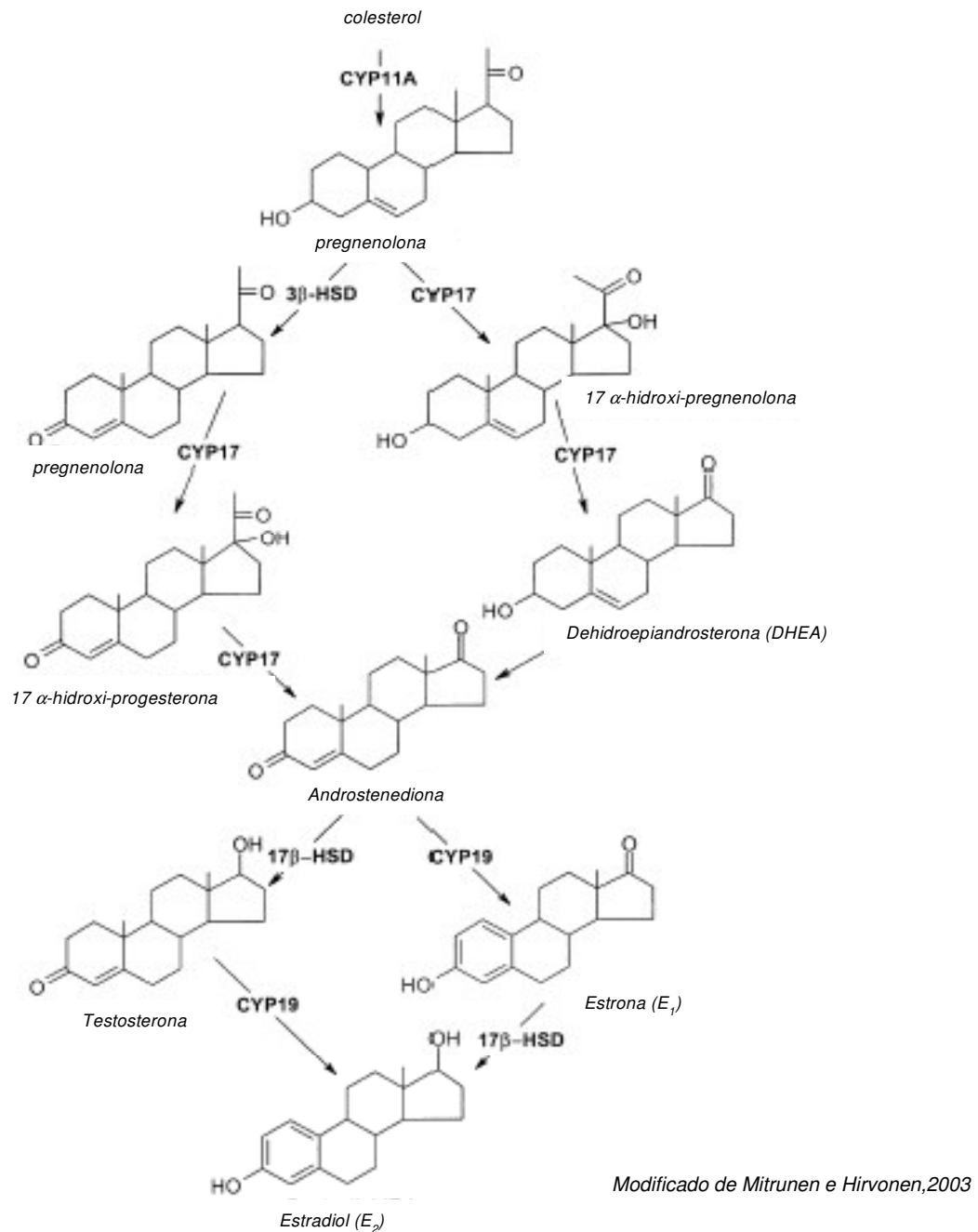


Figura 1. Biossíntese do estradiol a partir da cadeia de colesterol.

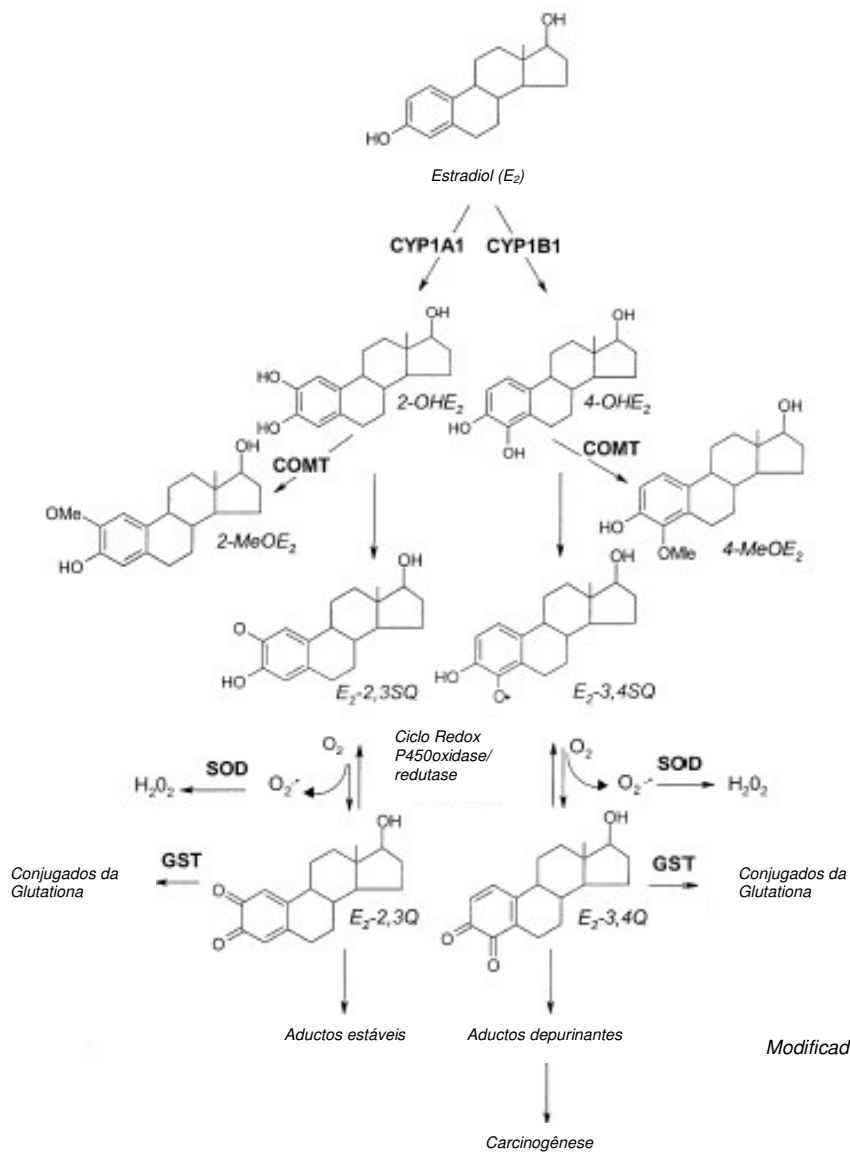


Figura 2. Metabolismo do estrógeno.

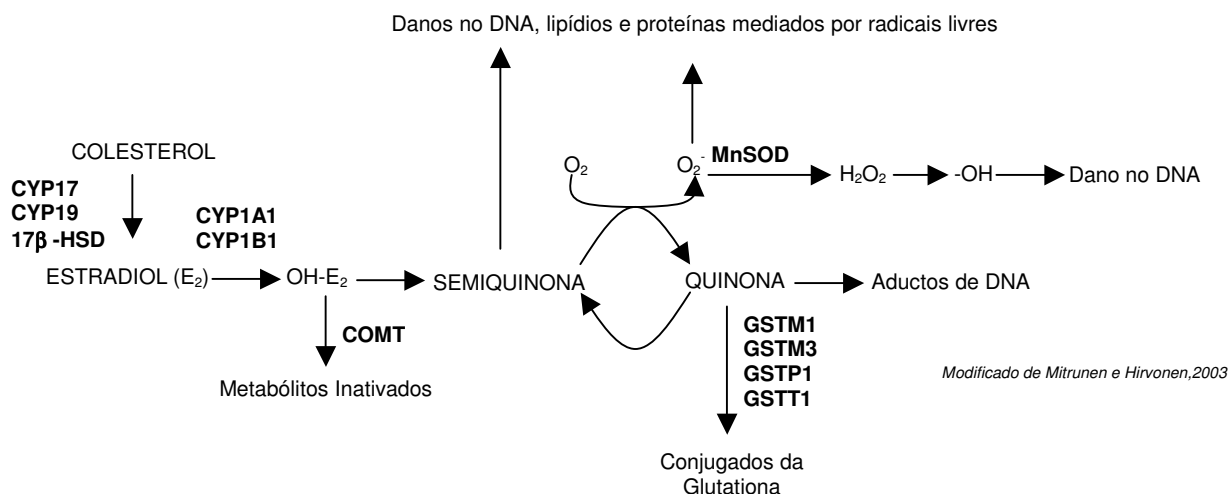


Figura 3. Representação esquemática das enzimas cujos polimorfismos são conhecidos e que estão envolvidas na biossíntese e metabolização de estrógenos.

1.3 Mutagênese, carcinogênese e a importância dos biomarcadores de efeito e de suscetibilidade

O genoma de todos os organismos vivos está constantemente sob o efeito de agentes exógenos ou endógenos que modificam a integridade química do DNA alterando, conseqüentemente, seu conteúdo de informações (Pages e Fuchs, 2002). Essas alterações incluem anormalidades cromossômicas, amplificações gênicas e aquisição de novas mutações que são responsáveis pela instabilidade genômica e desempenham um importante papel na carcinogênese. Assim, a maior causa deflagradora do processo carcinogênico é a instabilidade genômica, um estado transitório ou persistente que causa uma série de eventos mutacionais que levam a alterações genéticas mais estáveis (Jefford e Irminger-Finger, 2006).

Assim, as mutações originadas em genes que controlam tanto a fidelidade de síntese e reparo de DNA quanto a regulação do ciclo celular e da apoptose, aumentarão consideravelmente a taxa de mutação basal, podendo assim explicar a presença de múltiplas mutações encontradas nos tumores (Sarasin, 2003). Uma vez que a expressão gênica esteja alterada como conseqüência da instabilidade genômica, as células passam a exibir um crescimento anormal podendo invadir os tecidos vizinhos (Fenech, 2002; Pages e Fuchs, 2002).

As alterações presentes em linfócitos do sangue periférico humano como as aberrações cromossômicas, as trocas entre cromátides irmãs e os micronúcleos (MNs), têm sido consideradas ao longo de vários anos como biomarcadores de exposição genotóxica e de efeitos precoces de carcinógenos genotóxicos; assumindo que os mecanismos de formação dos danos cromossômicos são similares em diferentes tecidos, espera-se que os níveis de danos nos linfócitos reflitam os níveis de danos nos tecidos propensos ao câncer e assim indiquem o risco ao câncer (Abertini *et al.*, 2000; Norppa, 2004). Entretanto, alguns estudos epidemiológicos sugerem que a alta frequência de alterações citogenéticas atua como um fator preditivo para o risco ao desenvolvimento de câncer, mesmo em populações não expostas, uma vez que indicam a possível instalação de um processo de instabilidade genômica (Hagmar *et al.*, 1998; Bonassi *et al.*, 2000). Isso sugere um importante papel dos fatores de suscetibilidade individual como os diferentes polimorfismos dos genes metabolizadores de xenobióticos, de reparo do DNA e do metabolismo do folato (Norppa *et al.*, 2006).

Devido ao avanço do conhecimento a respeito das diferenças interindividuais na resposta à influência genotóxica, surgiu uma ampla categoria de biomarcadores de suscetibilidade (Aurand Ribeiro, 2003). A literatura aponta que alguns polimorfismos genéticos podem ser utilizados como biomarcadores uma vez que podem influenciar a expressão de efeitos biológicos, como o desenvolvimento de câncer e de outros problemas de saúde resultantes da exposição aos mutagênicos ambientais (Salama *et al.*, 2001).

Considerando todas as informações citadas acima pode-se dizer que a coincidência entre os efeitos genotóxicos e a carcinogênese aumenta o interesse pelos estudos epidemiológicos citogenéticos e moleculares que têm por objetivo relacionar os polimorfismos em genes de reparo do DNA e de biometabolização e os biomarcadores de dano no DNA com o risco ao câncer (Fenech, 2002).

2. OBJETIVOS

Uma vez que existe a hipótese de que as enzimas produzidas pelos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* podem alterar a produção e metabolização de estrógenos em virtude de alguns polimorfismos existentes nesses genes e uma vez que os produtos metabólicos gerados por estas enzimas podem agir como agentes genotóxicos lesando a molécula de DNA, tornando o indivíduo mais suscetível a carcinogênese mamária já que este é o tecido alvo da ação estrogênica, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar em mulheres com câncer de mama ainda sem tratamento quimioterápico e/ou radioterápico bem como em mulheres sadias, a influência dos diferentes polimorfismos dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* na suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama e na presença de lesões no DNA.

Objetivos específicos

- determinar a frequência de micronúcleos e a extensão de danos no DNA (detectada pelo Ensaio Cometa) presentes em linfócitos do sangue periférico da amostra estudada;
- determinar frequência dos polimorfismos dos genes: *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* na amostra de estudo;
- avaliar se existe relação entre os polimorfismos estudados e a suscetibilidade individual para o desenvolvimento de CM na amostra de estudo.
- avaliar se existe algum tipo de associação entre os diferentes polimorfismos dos genes acima citados com a frequência de micronúcleos e com a extensão de danos no DNA (detectada pelo Ensaio Cometa) na amostra de estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

A amostra populacional do presente estudo é constituída de 235 mulheres, sendo 104 pacientes diagnosticadas com câncer de mama do tipo ductal *in situ* ou ductal invasor (média de idade 53,2 anos), segundo critérios clínicos e anátomo-patológicos, e admitidas para tratamento no Ambulatório de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – USP. No grupo controle participaram 131 mulheres (média de idade 45,1 anos) também encaminhadas ao Ambulatório de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – USP para investigação de lesões na mama. Após avaliação clínica, análise de imagens de ultra-sonografia e/ou mamografia e quando necessário, análise de material coletado por biópsia, confirmou-se a ausência de tumores ou outras lesões malignas nas mamas, bem como a ausência de qualquer outro tipo de neoplasia.

Todas as mulheres que participaram da pesquisa foram esclarecidas quanto aos objetivos do trabalho e autorizaram a coleta de material biológico (sangue periférico) após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP: 1217/2004) (Anexo B). Todas as participantes também responderam um questionário que tinha por objetivo obter informações referentes aos hábitos de vida, exposição às radiações ionizantes, uso de medicamentos e uso de suplementação alimentar (Anexo C).

As amostras de sangue coletadas tiveram dois destinos: análise molecular para detecção dos polimorfismos estudados por PCR-RFLP e análise citogenética para a detecção dos níveis basais de danos no DNA pelo teste do micronúcleo (MN) e pelo ensaio Cometa. Dessa forma, foram excluídas da análise citogenética as mulheres que apresentavam algum

tipo de patologia crônica como lupus eritematoso, *diabetes mellitus* ou outras, bem como as mulheres que faziam uso crônico de algum medicamento que pudesse interferir nos resultados obtidos. Também foram excluídas as pacientes com CM já haviam passado pelo processo de pré-quimioterapia no momento da coleta de sangue, inviabilizando assim a análise citogenética.

Uma vez que algumas mulheres foram excluídas da análise citogenética conforme justificado acima, os grupos para análise molecular, de micronúcleos e de lesões detectadas pelo ensaio Cometa arranjaram-se da seguinte maneira:

GRUPO	Nº de mulheres incluídas			
	PCR-RFLP	Teste do MN	Ensaio Cometa	Ensaio Cometa*
Controles	131	85	77	24
Pacientes	104	45	45	19

*Ensaio Cometa usando as enzimas *ENDOIII* e *FPG*

3.2 Técnicas Citogenéticas

3.2.1 Teste do micronúcleo em linfócitos do sangue periférico

Foram feitas culturas de linfócitos do sangue periférico coletado em tubos Vacuntainer® (10 mL), contendo heparina sódica. Após sedimentação espontânea obteve-se o plasma com a camada de linfócitos e aproximadamente 15 gotas dessa mistura foram semeadas em 5mL meio de cultura completo constituído de 78% de meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com estreptomicina (Ceme 0,01 mg/mL) e penicilina (Fontoura Wyeth S.A., 0,005 mg/mL), 20% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e 2% de fitohemaglutinina (Gibco). As culturas foram mantidas por um tempo total de 72hs em estufa a 37°C. Para a obtenção de células binucleadas foram adicionados às culturas, após 44h de cultivo, 6µg/mL de cultura de citocalasina B (Cit-B) (Sigma).

A obtenção de células binucleadas seguiu a metodologia proposta por Fenech e Morley (1985), com pequenas modificações. Após 28h de incubação com Cit-B as culturas foram centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos e o sedimento celular foi cuidadosamente ressuscitado em 3mL de solução hipotônica de citrato de sódio (1%) a 4°C. Em seguida acrescentaram-se 3mL de fixador a 4°C (3 partes de metanol:1parte de ácido acético) e 5 gotas de formaldeído (37%). O material foi centrifugado a 1000 r.p.m. por 5 minutos e ressuscitado em 5mL de fixador a 4°C por mais duas vezes sendo que na última etapa as células foram ressuscitadas em 0,5mL de fixador.

Para a confecção das lâminas foram gotejadas 2 a 3 gotas de suspensão celular em lâminas previamente limpas e armazenadas em água destilada gelada. As lâminas foram secas à temperatura ambiente para posterior coloração.

A coloração foi feita usando-se solução de Giemsa diluído em tampão Sørensen (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06M, pH 6,8) na proporção 1:20 por 5 minutos, quando então as lâminas foram enxaguadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e armazenadas até o momento da análise.

A análise das lâminas foi feita em microscópio de luz de transmissão Zeiss (Germany). Foram contabilizadas 1000 células binucleadas por indivíduo com citoplasma íntegro e núcleos principais nitidamente delimitados. Foram considerados como micronúcleos os fragmentos com tamanho entre 1/16 e 1/3 dos núcleos principais, com coloração semelhante à coloração dos núcleos principais, sem emissão de refringência e sem sobreposição a qualquer um dos núcleos principais (Figura 4).

Para a obtenção do Índice de Divisão Nuclear (IDN) considerou-se a frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos numa população de 1000 células analisadas. O IDN é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{N}, \text{ onde}$$

M1 – M4: número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente

N: número total de células viáveis

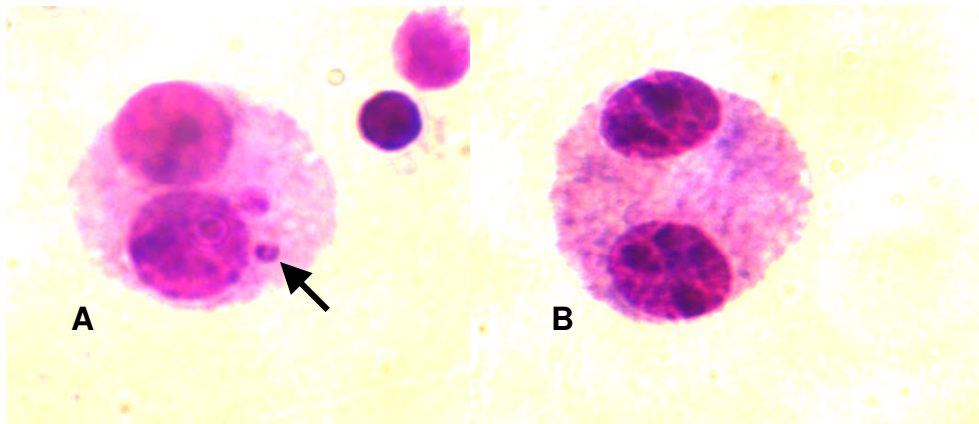


Figura 4. Célula binucleada micronucleada (A) (seta) e normal (B) obtida pelo Teste do Micronúcleo em linfócitos do sangue periférico de uma mulher com câncer de mama. Aumento 40X.

3.2.2 Ensaio Cometa

Foi utilizada a versão alcalina do Ensaio Cometa segundo a metodologia descrita por Singh *et al.* (1988) que consistiu em ressuspender 5 μ L de sangue total em 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Essa mistura homogênea foi pingada cuidadosamente sobre uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). O material foi coberto com uma lamínula (24 x 60mm) e deixado a 4°C por 5 minutos. A lamínula foi retirada delicadamente e as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise a 4°C (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por pelo menos duas horas. As lâminas foram então incubadas em um tampão de pH alcalino (NaOH 0,3 M e Na₂EDTA 1 mM, pH > 13) durante 20 minutos e posteriormente foram transferidas para uma cuba de eletroforese horizontal contendo o mesmo tampão também a 4°C onde aplicou-se por 20 minutos uma corrente elétrica de 25V e 300mA. As lâminas foram então lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, secas à temperatura ambiente e fixadas etanol absoluto por 3 minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata e armazenadas em geladeira até o momento da análise.

3.2.3 Ensaio Cometa para detecção de danos oxidativos

O ensaio Cometa permite a adequação de algumas etapas intermediárias que aumentam a especificidade do tipo de lesão no DNA a ser detectada. Assim após a etapa de lise, foi feita a incubação com uma endonuclease de reparo lesão-específica que permite a expressão de danos específicos de base na forma de quebras de fita simples. Foi utilizada a formamido pirimidina glicosilase (*FPG*), e a endonuclease III (*ENDOIII*), enzimas recomendadas para a detecção de dano oxidativo em bases de DNA (Speit *et al.*, 2004). A *ENDO III* converte as pirimidinas oxidadas em quebras de fita que podem ser detectadas pelo ensaio Cometa. A *FPG* está envolvida no primeiro passo do reparo por excisão de bases para remover algumas bases modificadas do DNA criando assim um sítio apurínico ou apirimidínico o qual é subseqüentemente clivado por uma AP liase formando assim uma falha na molécula de DNA que também pode ser detectada pelo ensaio Cometa. A *FPG* cliva principalmente 2,6-diamino-4-hidroxi-5-N-metil formamidopirimidina e a 7,8-diidro-8-ox-2`deoxiguanina (8-oxo-G) (Tchou *et al.*, 1991; Boiteux *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1993). Após a etapa de lise descrita no item 3.1.2, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em solução de PBS 1X e posteriormente passaram por uma bateria de lavagens em tampão F de reação de enzimas (40mM HEPES-KOH, 0,1mM KCl, 0,5mM EDTA, 0,2mg/mL BSA, pH 8,0) por 3 vezes, 5 minutos cada vez. Sobre cada lâmina foram pipetados 50µL de enzima *FPG* (New England Biolabs) ou *ENDOIII* (New England Biolabs) diluída em tampão de reação (1U/lâmina). As lâminas foram cobertas com lamínulas (24 x 60mm) e incubadas a 37°C por 45 minutos em câmara úmida (Hybrite, Vysis). Após esse tempo de incubação as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e procedeu-se a etapa de eletroforese, neutralização e fixação conforme descrito no item 3.1.2.

A análise de todas as lâminas do ensaio Cometa foi feita após coloração com brometo de etídio (20µg/mL), em microscópio de epi-fluorescência Zeiss (Germany), usando filtro 516-560 nm e barreira de filtro de 590 nm e objetiva de 40X. Foram capturadas aleatoriamente 50

imagens de nucleóides íntegros e em forma de cometa (Figura 5) usando-se uma câmera Axiocan (Zeiss) pelo programa AxioVision 3.1 (Zeiss). As imagens foram analisadas pelo programa Comet Score®, da Tritex, cujo acesso é gratuito. Os parâmetros considerados pela leitura do programa foram a porcentagem de DNA na cauda do cometa, o Momento da Cauda e o Momento Olive da cauda.

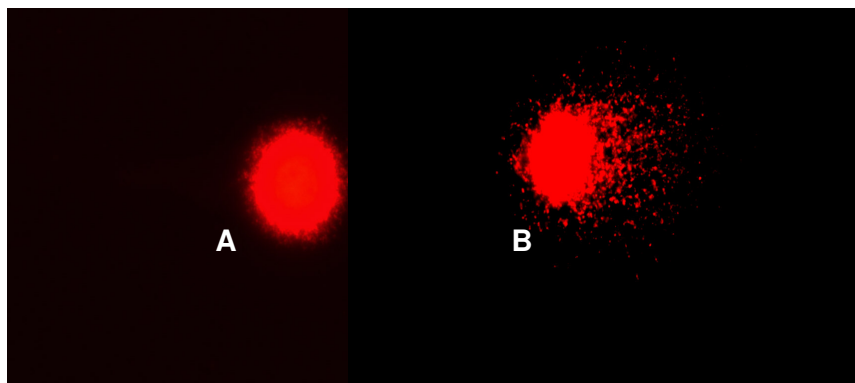


Figura 5. Nucleóide íntegro (A) e em forma de cometa (B) obtido pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de uma mulher com câncer de mama. Aumento 40X.

3.3 Técnicas Moleculares

3.3.1 Extração de DNA Genômico

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico coletado em tubos (5mL) contendo solução de EDTA 6% utilizando-se o Kit WIZARD® (Genomic DNA Purification) da Promega (Madison, WI), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.3.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi feita usando o aparelho GENEQuant (G.E.) por absorbância ultravioleta. Todo DNA para uso foi estocado a -20°C em alíquotas de $50\mu\text{L}$ numa concentração de $100\text{ng}/\mu\text{L}$.

3.3.3 Amplificação das seqüências de DNA por PCR

A amplificação das seqüências de DNA dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* foi feita em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) em microtubos de 0,5mL contendo um volume final de reação de 25µL.

A reação de amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* seguiu as condições propostas por Kuligina *et al.* (2000), Zheng *et al.* (2000), Carstensen *et al.* (1993) e Matsui *et al.* (2000), respectivamente, conforme descrito nas Tabelas 1 e 2.

Para verificar o sucesso da amplificação dos fragmentos de interesse, uma alíquota de 5µL do produto de reação de amplificação foi misturada a 5µL de carregador (glicerol/azul de bromofenol) e aplicada em um gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. Esse gel foi submetido a uma eletroforese de 100 a 140V por até 60 minutos dependendo do tamanho do fragmento de interesse a ser visualizado. A visualização do fragmento foi feita em um transluminador ultravioleta comparando-se o tamanho do fragmento de interesse com um DNA marcador de 100 ou 50pb (Invitrogen).

Tabela 1. Sequências iniciadoras e condições de reação para amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT*.

Genes	Iniciadores	Composição da reação (25µL)
<i>CYP17</i> (145pb)	F: 5`CAAGGTGAAGATCAGGGTAG 3` R: 5`GCTAGGGTAAGCAGCAAGAG 3`	Tampão de reação 1X (20Mm Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 1,5mM MgCl ₂ (Invitrogen); 0,1mM dNTPs (Invitrogen); 0,5µM de cada iniciador (Invitrogen); 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen),), 1µL de DNA genômico (100ng/µL), água ultra-pura e estéril q.s.p.
<i>CYP1B1</i> (650pb)	F: 5` TCACTTGCTTTTCTCTCTCC 3` R: 5` AATTCAGCTTGCCTCTTG 3`	Tampão de reação 1X (20Mm Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 1,5mM MgCl ₂ (Invitrogen); 0,2mM dNTPs (Invitrogen); 0,5µM de cada iniciador (Invitrogen); 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1µL de DNA genômico (100ng/µL), água ultra-pura e estéril q.s.p.
<i>CYP1A1</i> (340pb)	F: 5` TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3` F: 5` CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT 3`	Tampão de reação 1X (20Mm Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 2mM MgCl ₂ (Invitrogen); 0,2mM dNTPs (Invitrogen); 0,4µM de cada iniciador (Invitrogen); 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen),), 2µL de DNA genômico (100ng/µL), água ultra-pura e estéril q.s.p.
<i>COMT</i> (234pb)	F: 5`TACTGTGGCTACTCAGCTGT 3` R: 5`TGAAGCTGGTGTGAACACCT 3`	Tampão de reação 1X (20Mm Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 1,5mM MgCl ₂ (Invitrogen); 0,2mM dNTPs (Invitrogen); 0,5µM de cada iniciador; 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen),), 1µL de DNA genômico (100ng/µL), água ultra-pura e estéril q.s.p.

Tabela 2. Condições de temperatura e tempo para amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT*.

Genes	Temperatura, tempo e número de ciclos
<i>CYP17</i>	94°C / 3min; 35ciclos (94°C / 30seg, 59°C / 40seg, 72°C / 40seg); 72° / 10min
<i>CYP1B1</i>	94°C / 1min; 35ciclos (94°C / 30seg, 60°C / 30seg, 72°C / 40seg); 72° / 7min
<i>CYP1A1</i>	94°C / 5min; 30ciclos (94°C / 1min, 57°C / 1min, 72°C / 1min e 30seg); 72° / 2min
<i>COMT</i>	94°C / 3min; 33ciclos (94°C / 30seg, 59°C / 40seg, 72°C / 40seg); 72° / 10min

3.3.4 Detecção dos polimorfismos por PCR-RFLP

O produto da reação de amplificação de cada um dos genes de estudo foi submetido a uma digestão por enzima de restrição durante pelo menos 12 horas a 37°C segundo as condições a seguir:

***CYP17*:** 3µL de produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEB4, New England BioLabs), BSA (10µg/µL), 8U da enzima *MspA1I* (New England BioLabs), água ultra-pura estéril q.s.p.; volume final de 20µL.

***CYP1B1*:** 3µL de produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEB2, New England BioLabs), 40µM de S-adenosilmetionina, 8U da enzima *AcuI* (New England BioLabs), água ultra-pura estéril q.s.p.; volume final de 20µL.

***CYP1A1*:** 20µL de produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEB2, New England BioLabs), 5U da enzima *MspI* (New England BioLabs), água ultra-pura estéril q.s.p.; volume final de 25µL.

COMT: 3µL de produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEB4), BSA (10µg/µL), 5U da enzima *NlaIII* (New England BioLabs), água ultra-pura estéril q.s.p.; volume final de 20µL.

A observação dos fragmentos dos genes *CYP17*, *CYP1B1* e *COMT* digeridos com as enzimas *MspA1I*, *AcuI* e *NlaIII*, respectivamente, foi feita após uma eletroferese de pelo menos 4 horas a 120V em gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata. A visualização do fragmento do gene *CYP1A1* digerido com a enzima *MspI* foi feita após eletroforese em de gel de agarose 2% contendo brometo de etídio, utilizando-se um transluminador ultravioleta.

Para o gene *CYP17*, a substituição de T→C na posição 1931 cria um sítio reconhecido pela enzima *MspA1 I* que cliva o fragmento de 145pb e gera dois fragmentos de 70 e 45pb (Figura 6).

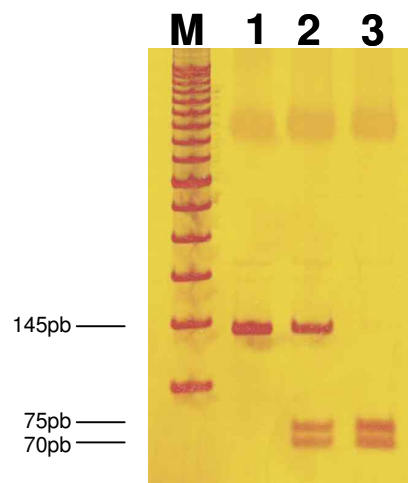


Figura 6. PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *CYP17* T→C na posição 1931 detectado pela enzima *MspA1I*, onde M = marcador de peso molecular (50pb). Linha 1: homozigoto para o alelo selvagem (A1/A1). Linha 2: heterozigoto (A1/A2). Linha 3: homozigoto para o alelo mutante (A2/A2).

A transversão G→C no éxon 3 do gene *CYP1B1* gera um sítio de restrição reconhecido pela enzima *Acu I* que cliva o fragmento de 650pb em dois fragmentos de 310 e 340pb (Figura 7).

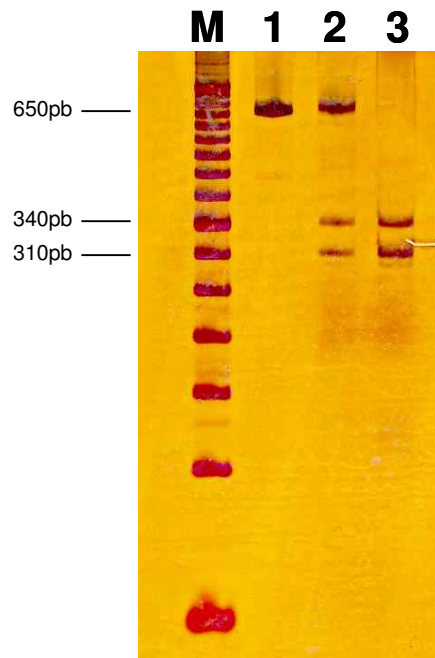


Figura 7. PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *CYP1B1* G→C (Val→Leu) detectado pela enzima *AclI*, onde M = marcador de peso molecular (50pb). Linha 1: homocigoto para o alelo selvagem (Val/Val). Linha 2: heterocigoto (Val/Leu). Linha 3: homocigoto para o alelo mutante (Leu/Leu).

O fragmento de 340pb do gene *CYP1A1* refere-se ao alelo selvagem (m1/m1), mas quando o alelo mutante (m2) está presente, ele gera um sítio de restrição para a enzima *MspI* que cliva o produto gênico amplificado em fragmentos de 200 e 140pb (m2/m2) (Figura 8).

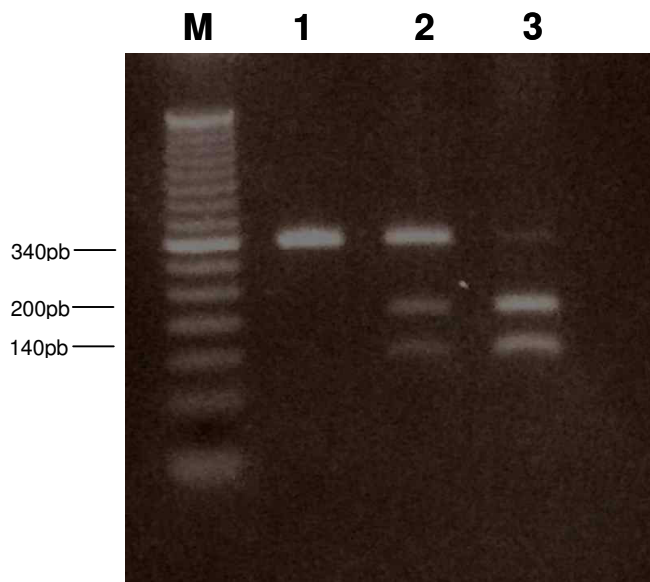


Figura 8. PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *CYP1A1* T→C detectado pela enzima *MspI*, onde M = marcador de peso molecular (50pb). Linha 1: homocigoto para o alelo selvagem (m1/m1). Linha 2: heterocigoto (m1/m2). Linha 3: homocigoto para o alelo mutante (m2/m2).

Por fim, a troca de uma guanina por uma adenina no códon 158 do gene *COMT* gera um sítio de restrição para a enzima *Nla III* que cliva o fragmento de 234pb em fragmentos de 96, 54, 39, 27 e 18pb sendo que os fragmentos de 96 e 18pb são o produto da clivagem da enzima no sítio exato do polimorfismo de interesse uma vez que o fragmento do alelo selvagem apresenta 114pb (Figura 9).

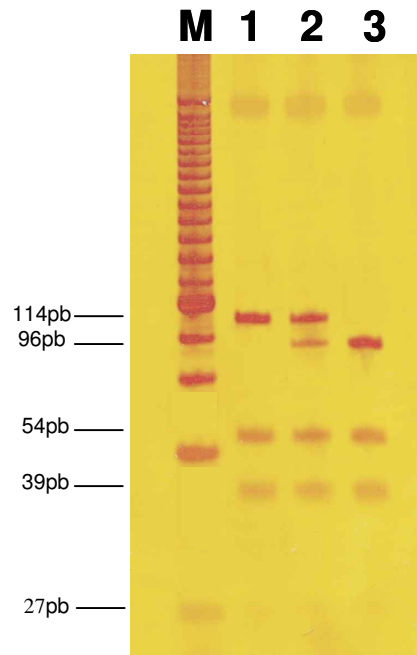


Figura 9. PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *COMT* G→A detectado pela enzima *NlaIII*, onde M = marcador de peso molecular (25pb). Linha 1: homozigoto para o alelo selvagem (Val/Val). Linha 2: heterozigoto (Val/Met). Linha 3: homozigoto para o alelo mutante (Met/Met).

3.4 Análise estatística

As variáveis numéricas como a média de micronúcleos, a porcentagem de DNA na cauda do cometa, o Tail Moment (TM) e o Olive Tail Moment (OTM) foram analisadas pelo teste de Wilcoxon & Mann-Whitney. Para verificar a significância estatística das associações entre as freqüências dos genótipos estudados na amostra total de pacientes e controles, foi aplicado o teste exato de Fisher (Agresti, 1992). A análise estatística foi feita levando-se em consideração

os dados clínicos, citogenéticos e moleculares tendo como critério de significância um nível de probabilidade (P) menor ou igual a 0,05. A “odds ratio” e o intervalo de confiança (IC) de 95% (Kleinbaum *et al.*, 1982) foram calculados como uma estimativa de risco relativo e grau de associação.

Todas as análises foram realizadas pelo software InStat (GraphPad InStat, versão 3.0, GraphPad Software) e pelo software SigmaStat 1.0 (Jandel Scientific).

A consultoria para a análise estatística foi gentilmente prestada pelo Prof. Dr. José Carlos Barbosa do Departamento de Matemática e Estatística da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP *campus* de Jaboticabal.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização geral da amostra de pacientes com câncer de mama e controles estudados

A TABELA 3 apresenta os dados referentes à caracterização da amostra populacional quanto à idade, ao hábito tabagista, à idade da menarca e da menopausa relatada, ao uso de hormônios como contraceptivos ou terapia de reposição hormonal, ao número de gestações e à presença de familiares com câncer.

Verificou-se que a presença de mulheres acima dos 45 anos de idade foi significativamente maior no grupo de pacientes com CM do que no grupo de controles ($P=0,01$), porém a média de idade para o grupo de pacientes foi de 53,2 anos enquanto que para o grupo controle foi de 45,1 anos. Observou-se também que a distribuição de mulheres com hábito tabagista foi semelhante entre pacientes e controles. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles quando se avaliou a idade da menarca ou da menopausa, sendo que em ambos os grupos, prevaleceram mulheres com idade da menarca menor ou igual a 13 anos de idade e menopausa com 45 anos de idade ou mais.

Com relação ao uso hormonal em algum momento da vida, observou-se que pacientes e controles fizeram uso tanto de contraceptivos orais quanto de terapia de reposição hormonal de modo semelhante. No que diz respeito à idade da primeira gestação a maioria das pacientes com CM (78%) e dos controles (77,1%) teve a sua primeira gestação antes dos 30 anos de idade. Ainda com relação a esse parâmetro, não se observou diferença estatisticamente significativa quanto ao número de mulheres nuligestas entre o grupo de pacientes e controles.

Finalmente, a freqüência da presença de familiares que tiveram câncer foi estatisticamente semelhante entre pacientes com CM e controles.

Na TABELA 4 é possível observar a caracterização histo-patológica da amostra populacional de pacientes com CM estudada. O tamanho tumoral mais freqüente foi T2 (42,3%) e o tipo tumoral mais representado foi o Carcinoma Ductal Invasor (CDI) grau II (53,9%). Outra

característica clínica considerada foi a presença ou ausência de metástase à distância, sendo observado que apenas 8,6% das mulheres com CM estudadas manifestaram processo de metástase pelo menos até o momento em que os dados aqui apresentados foram coletados. A análise histo-patológica das amostras tumorais mostrou que 62,5% foram positivas para os receptores de estrógeno, 53,9% positivas para os receptores de progesterona, 27,9% e 32,7% expressaram a P53 mutada e a oncoproteína Cerb-B2, respectivamente.

Com relação à etnia, observou-se que no grupo de pacientes a distribuição de brancos, pardos e negros foi de 80,7%, 12,5% e 6,8%, respectivamente, enquanto que nos controles essa distribuição foi de 84,7%, 12,2% e 3,1, não havendo portanto diferenças estatísticas (GRÁFICO 1).

Tabela 3. Caracterização geral da amostra de pacientes com CM e controles quanto à idade, ao hábito tabagista, à idade da menarca ou da menopausa, ao uso hormonal, à idade da primeira gestação a termo e ao parentesco com pessoas com câncer.

Fator	Pacientes (n = 104)		Controles (n= 131)		Valor de P
	n	%	n	%	
<i>Idade</i>					
≤ 45 anos	35	33,7	67	51,1	0,01
> 45 anos	69	66,3	64	48,9	
<i>Tabagismo</i>					
Não-fumantes	59	76,6	99	75,6	0,99
Fumantes	18	23,4	32	24,4	
NI	27	-	-	-	
<i>Menarca</i>					
≤ 13 anos	45	58,4	78	59,5	0,99
> 13 anos	32	41,6	53	40,5	
NI	27	-	-	-	
<i>Menopausa</i>					
≤ 45 anos	20	36,4	23	33,8	0,91
> 45 anos	35	63,6	45	66,2	
NI ou NEC	49	-	63	-	
<i>Uso de hormônios</i>					
ACO					
Sim	29	37,6	67	51,1	0,08
Não	48	62,4	64	48,9	
NI	27	-	-	-	
TRH					
Sim	13	16,9	23	17,5	0,90
Não	64	83,1	108	82,5	
NI	27	-	-	-	
<i>Gestações</i>					
< 30 anos	60	78	101	77,1	0,15
> 30 anos	8	10,3	5	3,8	
nuligesta	9	11,7	25	19,1	0,23
NI	27	-	-	-	
<i>Familiares com câncer</i>					
Sim	43	55,8	62	47,3	0,29
Não	34	44,2	69	52,7	
NI	27	-	-	-	

*Teste χ^2 com $\alpha = 0,05$

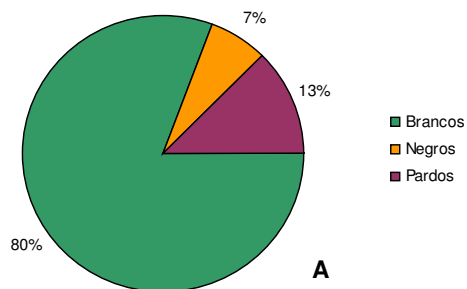
NI: não informado; NEC: não se encaixa no critério; ACO: Contraceptivo oral; TRH: Terapia de Reposição Hormonal

Tabela 4. Caracterização clínico-patológica da amostra de mulheres com CM.

Fatores	n	%	Fatores	n	%
<i>Tamanho Tumoral</i>			<i>P53</i>		
T1	34	32,7	Positivo	29	27,9
T2	44	42,3	Negativo	51	49
T3-T4	26	25	ND	24	23,1
<i>Tipo/Grau</i>			<i>Cerb-B2</i>		
CDI-I	15	14,4	Positivo	34	32,7
CDI-II	56	53,9	Negativo	66	63,5
CDI-III	27	26	ND	4	3,8
Carc. <i>In situ</i>	6	5,7	<i>Linfonodo</i>		
<i>Receptores de Estrógeno</i>			Positivo	33	31,7
Positivo	65	62,5	Negativo	62	59,6
Negativo	32	30,8	ND	9	8,7
ND	7	6,7	<i>Metástase à distância</i>		
<i>Receptores de Progesterona</i>			Presente	9	8,6
Positivo	56	53,9	Ausente	68	65,4
Negativo	41	39,4	ND	27	26
ND	7	6,7			

CDI: Carcinoma ductal invasor; ND: Não detectado

Distribuição das diferentes etnias no grupo de pacientes



Distribuição das diferentes etnias no grupo de controles

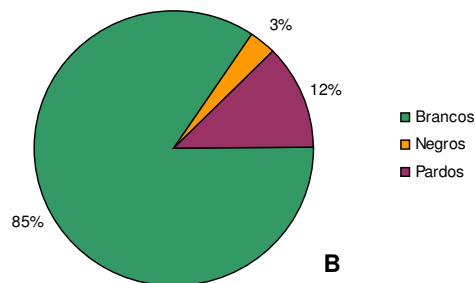


GRÁFICO 1: Valores (%) das freqüências das diferentes etnias representadas no grupo de mulheres com CM (A) e controles (B) estudado.

4.2 Análise da extensão dos níveis basais de lesões no DNA detectadas pelo teste do micronúcleo e pelo Ensaio Cometa

Para o estudo dos níveis basais de lesões no DNA foram incluídas 45 pacientes (média de idade 51,4 anos) e 85 controles (média de idade 44,7 anos) da amostra total. O grupo de pacientes foi composto por 75% de não-fumantes e 25% de fumantes enquanto que o grupo controle apresentou 78% de não-fumantes e 22% de fumantes (dados não apresentados em tabelas ou gráficos).

A TABELA 5 mostra os valores médios do número de MNs por 1000 células binucleadas analisadas, do número de células binucleadas micronucleadas (CBMN) e do IDN calculados para o grupo de pacientes com CM e controles de acordo com o hábito tabagista. Para ambos os grupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre fumantes e não-fumantes com relação ao número de MN e de CBMN. Ao comparar pacientes não-fumantes com controles não-fumantes observou-se que as médias de MN e de CBMN foram significativamente maiores ($p < 0,01$) no grupo de pacientes (21,9 e 19,8, respectivamente) do que no grupo controle (10,4 e 9,5, respectivamente). Da mesma forma, pacientes fumantes apresentaram valores médios de MN (26,9) e de CBMN (24,2) maiores do que controles fumantes (10,7 e 9,7, respectivamente) ($p < 0,01$). Também foi feita a análise dos valores da média de MN e do IDN no grupo de pacientes e de controles independentemente do hábito tabagista e ainda assim observou-se que pacientes apresentaram médias estatisticamente maiores do que controles para a freqüência de MNs ($p < 0,01$). Com relação ao IDN, nenhuma comparação feita mostrou valores estatisticamente diferentes entre pacientes e controles.

Os resultados apresentados na TABELA 6 mostram os valores médios de MN, de CBMN e do IDN em pacientes e controles de acordo com a idade. A primeira comparação, feita entre mulheres acima ou abaixo de 40 anos, mostrou que tanto dentro do grupo de pacientes quanto no grupo de controles, os valores médios de MN e de CBMN não apresentaram diferenças que fossem estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Também foram feitas comparações entre

pacientes com CM e controles abaixo ou com idade maior ou igual a 40 anos. As médias de MN e CBMN no grupo de pacientes abaixo dos 40 anos de idade foram 17,6 e 16,2, respectivamente. Esses valores foram significativamente maiores do que os encontrados no grupo controle, onde a média de MN e de CBMN foi de 9,2 e 8,5, respectivamente ($p < 0,01$). No que diz respeito ao IDN, nenhuma comparação feita mostrou diferenças significativas entre pacientes e controles.

Com relação à idade, também foi feita uma fragmentação das faixas etárias considerando-se intervalos de 15 anos (TABELA 7). Nessa análise foi considerada apenas a média de MN obtida em pacientes e controles. Dentro do grupo de pacientes, a média de MN foi de 20,5, 23,1 e 24,3 para as faixas etárias de 24-40 anos, 41-55 anos e ≥ 56 anos, respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa. Com relação aos controles, a média de MN foi 9,8 (41-55 anos), 11,4 (≥ 56 anos) e 9,2 (≥ 56 anos), sem diferenças estatísticas consideráveis.

Foi feita a análise das médias de MN e do IDN dentro do grupo de pacientes considerando-se as características clínico-patológicas desse grupo de mulheres. Esses resultados estão apresentados na TABELA 8 e mostram que a média de MN nos diferentes tamanhos tumorais T1, T2 e T3-T4 foram de 22,9, 22,2 e 25, respectivamente, sem diferença estatística.

Com relação à presença dos receptores de estrógeno e de progesterona, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na média de MN entre receptores positivos ou negativos ($P=0,62$ e $P=0,99$ para receptores de estrógeno e progesterona, respectivamente) (TABELA 8).

A análise de P53 mostrou que pacientes com ausência de expressão da proteína P53 mutada apresentaram uma média de MN maior (26,8) do que pacientes com positividade para a expressão dessa proteína, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,12$). Quanto à expressão da proteína Cerb-B2 pacientes positivas para a expressão de

Cerb-B2 apresentaram média de MN de 25,1, enquanto que para pacientes Cerb-B2 negativo a média foi de 22,4, não sendo estatisticamente significativa essa diferença ($P=0,38$). Da mesma forma não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos valores médios de MN entre pacientes com linfonodos positivos (22,4) e negativos (23,5) ($P=0,72$) e com presença (24,3) ou ausência de metástases (22,8) ($P=0,78$) (TABELA 8).

Os resultados referentes aos danos no DNA detectados pelo Ensaio Cometa estão apresentados nas TABELAS 9, 10, 11, 12 e 13.

A TABELA 9 mostra a % de DNA, o TM e o OTM dentro do grupo de controles e de pacientes com CM considerando-se o hábito tabagista. Dentro do grupo de controles, fumantes e não fumantes apresentaram valores médios estatisticamente similares dos parâmetros considerados. Da mesma forma, pacientes fumantes e não fumantes não diferiram entre si no que diz respeito à % de DNA, ao TM e ao OTM. Entretanto, quando se comparam pacientes e controles com mesmo hábito tabagista, é possível observar que os valores médios da % de DNA, do TM e do OTM são significativamente maiores no grupo de pacientes (5,5, 5,6 e 5,4, respectivamente) do que no grupo controle (3,9, 2,3 e 3,2, respectivamente) ($p<0,05$).

Na TABELA 10 é possível observar os dados obtidos pelo Ensaio Cometa considerando-se a idade menor ou maior ou igual 40 anos. Os resultados mostram que tanto dentro do grupo de pacientes quanto dentro do grupo de controles, os níveis de danos no DNA são similares entre mulheres acima ou abaixo dos 40 anos de idade. Quando a comparação é feita entre pacientes abaixo de 40 anos e controles abaixo de 40 anos, observa-se que os valores da % de DNA, do TM e do OTM são significativamente maiores nas pacientes do que nos controles ($P<0,01$), achados que se repetem nos grupos com idade igual ou acima dos 40 anos de idade ($P<0,01$).

Também foi feita a análise dos danos detectados pelo Ensaio Cometa em pacientes e controles considerando-se faixas etárias em intervalos de 15 anos. Os dados obtidos mostram

que não há diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias consideradas tanto dentro do grupo de pacientes quanto dentro do grupo de controles (TABELA 11).

Na TABELA 12 estão os resultados referentes à % de DNA, ao TM e ao OTM obtidos considerando-se as características clínico-patológicas das pacientes com câncer de mama. Os diferentes tamanhos tumorais T1, T2 e T3-T4 tiveram valores semelhantes de danos no DNA ($p=0,73$). Da mesma forma, outros marcadores como os receptores de estrógeno, receptores de progesterona, P53 e Cerb-B2, sendo eles positivos ou negativos, apresentaram valores significativamente semelhantes para os parâmetros obtidos pelo Ensaio Cometa.

O Ensaio Cometa também foi realizado utilizando-se as enzimas ENDOIII e FPG, capazes de converter alguns tipos específicos de danos oxidativos em quebras nas fitas do DNA. Esses resultados estão apresentados na TABELA 14.

Após o tratamento com ENDOIII ou com FPG observou-se a % de DNA, o TM e o OTM foi maior no grupo de pacientes (9,4, 14,2 e 10,7, respectivamente) do que no grupo controle (6,5, 7,3 e 6,5, respectivamente); no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Ainda na TABELA 14, pode ser verificado que pacientes e os controles não diferiram significativamente na quantidade de lesões no DNA detectadas pelo Ensaio Cometa após a utilização da enzima FPG ($P=0,96$ para a % de DNA; $P= 0,11$ para o TM e $P=0,86$ para o OTM).

Tabela 5. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (CBN), de células binucleadas micronucleadas (CBMN) por 1000 CBN analisadas e do índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e controles sadias, de acordo com o hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

Grupo	MN/1000 CBN		CBMN/1000 CBN		IDN	
	média \pm EP	P	média \pm EP	P	média \pm EP	P
<i>Controles (n = 85)</i>						
Não-fumantes (n = 66)	10,4 \pm 0,7	-	9,5 \pm 0,7	-	2,0 \pm 0,04	-
Fumantes (n = 19)	10,7 \pm ,5	-	9,7 \pm 1,2	-	2,0 \pm 0,11	-
Total	10,4 \pm 0,7	-	9,6 \pm 0,6	-	2,0 \pm 0,04	-
<i>Pacientes (n = 45)</i>						
Não-fumantes (n = 34)	21,9* \pm 1,3	< 0,01	19,8* \pm 1,1	< 0,01	1,9 \pm 0,07	0,74
Fumantes (n = 11)	26,9* \pm 4,0	< 0,01	24,2* \pm 3,6	< 0,01	1,7 \pm 0,32	0,19
Total	23,2* \pm 1,4	< 0,01	20,9* \pm 1,2	< 0,01	1,8 \pm 0,06	0,82

P: Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (comparação entre pacientes e controles com hábito tabagista igual)
 * estatisticamente diferente em relação ao grupo controle com mesmo hábito tabagista

Tabela 6. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (CBN), de células binucleadas micronucleadas (CBMN) por 1000 CBN analisadas e do índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e controles sadias, considerando a idade acima ou abaixo de 40 anos. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

Grupo	MN/1000 CBN		CBMN/1000 CBN		IDN	
	média \pm EP	P	média \pm EP	P	média \pm EP	P
<i>Controles (n = 85)</i>						
< 40 anos (n = 24)	9,2 \pm 1,4	-	8,5 \pm 1,3	-	2,1 \pm 0,08	-
\geq 40 anos (n = 61)	10,9 \pm 0,7	-	10 \pm 0,7	-	1,9 \pm 0,05	-
<i>Pacientes (n = 45)</i>						
< 40 anos (n = 5)	17,6* \pm 4,5	< 0,01	16,2 \pm 4,4	< 0,01	1,9 \pm 0,21	0,82
\geq 40 anos (n = 40)	23,8* \pm 1,4	< 0,01	21,5* \pm 1,3	< 0,01	1,8 \pm 0,06	0,81

Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (comparação entre pacientes e controles com limite etário igual)

*estatisticamente diferente em relação ao grupo controle com limite etário igual

Tabela 7. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (CBN) em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico (casos) e controles sadias, considerando diferentes faixas etárias. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

Faixa Etária (anos)	PACIENTES (n=45)	CONTROLES (n=85)
	MN/1000 CBN Média \pm EP	MN/1000 CBN Média \pm EP
25 – 40	20,5 \pm 4,3	9,8 \pm 1,4
41 - 55	23,1 \pm 2,3	11,4 \pm 0,9
\geq 56	24,3 \pm 1,9	9,2 \pm 0,9
Valor de P*	0,28	0,69

*Teste Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks com $\alpha = 0,05$ comparando-se as médias de MN entre as diferentes faixas etárias dentro do mesmo grupo

Tabela 8. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (CBN) e do índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico considerando-se o tamanho tumoral, os receptores de estrógeno, os receptores de progesterona, a expressão de P53, a expressão de Cerb-B2, a presença de linfonodos acometidos por metástases e a presença de metástase à distância. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

Fatores	MN/1000 CBN		IDN	
	Média \pm EP	Valor de P	Média \pm EP	Valor de P
Tamanho Tumoral				
T1	22,9 \pm 2,4	-	1,9 \pm 0,1	-
T2	22,2 \pm 2	-	1,9 \pm 0,1	-
T3-T4	25 \pm 3,2	0,74	1,8 \pm 0,13	0,55
Receptores de Estrógeno				
Positivo	23,7 \pm 1,8		1,8 \pm 0,08	
Negativo	22,3 \pm 2,5	0,62	1,9 \pm 0,1	0,76
Receptores de Progesterona				
Positivo	23,2 \pm 1,8		1,9 \pm 0,09	
Negativo	23,2 \pm 2,4	0,99	1,8 \pm 0,09	0,91
P53				
Positivo	21,2 \pm 3		1,7 \pm 0,1	
Negativo	26,8 \pm 1,9	0,12	1,7 \pm 0,07	0,70
Cerb-B2				
Positivo	25,1 \pm 2,9		1,7 \pm 0,1	
Negativo	22,3 \pm 1,7	0,38	1,9 \pm 0,08	0,19
Linfonodos				
Positivo	22,4 \pm 2,3		1,9 \pm 0,11	
Negativo	23,5 \pm 1,8	0,72	1,8 \pm 0,07	0,7
Metástase à distância				
Presente	24,3 \pm 5,8		1,7 \pm 0,12	
Ausente	22,8 \pm 1,4	0,78	1,9 \pm 0,06	0,06

P: Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$

Tabela 9. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e controles sadias considerando o hábito tabagista e a idade. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Grupo	% DNA		TM		OTM	
	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P
<i>Controles (n = 77)</i>						
Não-fumantes (n = 60)	3,9 \pm 0,2	-	2,3 \pm 0,3	-	3,2 \pm 0,2	-
Fumantes (n = 17)	4,4 \pm 0,4	-	3,6 \pm 1,4	-	4 \pm 0,6	-
Total	4 \pm 0,1	-	2,5 \pm 0,4	-	3,4 \pm 0,2	-
<i>Pacientes (n = 40)</i>						
Não-fumantes (n = 36)	5,2* \pm 0,4	< 0,01	5,2* \pm 1,1	< 0,01	5,6* \pm 0,5	< 0,01
Fumantes (n = 4)	7,1* \pm 0,9	< 0,01	5,4* \pm 1,3	< 0,05	6,8* \pm 0,9	< 0,01
Total	5,5* \pm 0,4	< 0,01	5,6* \pm 1	< 0,01	5,4* \pm 0,5	< 0,01

P: Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (comparação entre pacientes e controles com hábito tabagista igual)
*estatisticamente diferente em relação ao grupo controle com mesmo hábito tabagista

Tabela 10. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e controles sadias, considerando a idade acima ou abaixo de 40 anos. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Grupo	% DNA		TM		OTM	
	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P
<i>Controles (n = 77)</i>						
< 40 anos (n = 18)	3,7 \pm 1,7	-	2,1 \pm 1,5	-	3,2 \pm 0,09	-
\geq 40 anos (n = 59)	4,1 \pm 0,2	-	2,2 \pm 0,5	-	3,4 \pm 0,2	-
<i>Pacientes (n = 40)</i>						
< 40 anos (n = 2)	7,6* \pm 1	< 0,01	6,7* \pm 2	< 0,01	8,6* \pm 1,1	< 0,01
\geq 40 anos (n = 38)	5,3* \pm 0,4	< 0,01	5,5* \pm 1	< 0,01	5,2* \pm 0,5	< 0,05

P: Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (comparação entre pacientes e controles com limite etário igual)
*estatisticamente diferente em relação ao grupo controle com limite etário igual

Tabela 11. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e controles sadias as diferentes faixas etárias. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Faixa Etária (anos)	PACIENTES (n=45)			CONTROLES (n=85)		
	%DNA	TM	OTM	%DNA	TM	OTM
	Média \pm EP	Média \pm EP	Média \pm EP	Média \pm EP	Média \pm EP	Média \pm EP
25 - 40	5,4 \pm 1,2	5,4 \pm 2,4	5,5 \pm 1,4	3,7 \pm 0,2	2,0 \pm 0,5	3,2 \pm 0,3
41 - 55	6,3 \pm 0,7	6,3 \pm 1,6	6,2 \pm 0,9	4,2 \pm 0,3	3,1 \pm 0,6	3,7 \pm 0,3
≥ 56	4,7 \pm 0,4	4,9 \pm 1,3	4,5 \pm 0,6	3,7 \pm 0,3	1,5 \pm 0,4	2,8 \pm 0,3
Valor de P	0,27	0,77	0,37	0,53	0,15	0,45

P: Teste Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks com $\alpha = 0,05$ comparando-se as diferentes faixas etárias dentro do mesmo grupo

Tabela 12. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico, considerando-se o tamanho tumoral, os receptores de estrógeno, os receptores de progesterona, a expressão de P53, a expressão de Cerb-B2, a presença de linfonodos acometidos por metástases e a presença de metástase à distância. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Fatores	%DNA		TM		OTM	
	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P
<i>Tamanho Tumoral</i>						
T1	6,1 \pm 0,6	-	6,7 \pm 1,8	-	6,2 \pm 0,9	-
T2	5,1 \pm 0,6	0,73	5,0 \pm 1,3	0,82	4,9 \pm 0,7	0,72
T3-T4	5,0 \pm 0,8		4,9 \pm 1,8		5,5 \pm 1	
<i>Receptores de Estrógeno</i>						
Positivo	5,6 \pm 0,5		6,1 \pm 0,5		5,6 \pm 0,6	
Negativo	5,1 \pm 0,8	0,35	4,8 \pm 1,6	0,99	5,0 \pm 0,9	0,53
<i>Receptores de Progesterona</i>						
Positivo	5,6 \pm 0,6		6,1 \pm 1,4		5,6 \pm 0,7	
Negativo	5,1 \pm 0,5	0,64	4,8 \pm 1,2	1,0	5,0 \pm 0,6	0,6
<i>P53</i>						
Positivo	4,0 \pm 0,6		2,2 \pm 0,6		3,2 \pm 0,8	
Negativo	4,8 \pm 0,5	0,5	3,9 \pm 0,7	0,29	4,6 \pm 0,6	0,45
<i>Cerb-B2</i>						
Positivo	4,9 \pm 0,7		4,8 \pm 1,1		4,8 \pm 0,8	
Negativo	5,6 \pm 0,4	0,43	5,6 \pm 1,4	0,71	5,5 \pm 0,6	0,51
<i>Linfonodos</i>						
Positivo	5,0 \pm 0,8		5,9 \pm 2,3		5,1 \pm 1,1	
Negativo	5,6 \pm 0,5	0,27	5,4 \pm 0,9	0,65	5,5 \pm 0,5	0,32
<i>Metástase à distância</i>						
Presente	6,6 \pm 1		5,3 \pm 0,6		7,1 \pm 1,1	
ausente	5,3 \pm 0,4	0,22	5,5 \pm 1	0,31	5,2 \pm 0,5	0,15

P: Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (casos em relação aos controles)

Tabela 13. Valores médios \pm Erro Padrão (EP) da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa sob tratamento com ENDOIII ou FPG em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e controles sadias, independentemente do hábito tabagista e da idade. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo

Grupo	%DNA		ENDOIII		OTM	
	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P
ENDOIII						
<i>Controles (n = 27)</i>	6,5 \pm 0,5	-	7,3 \pm 1,1	-	6,5 \pm 0,7	-
<i>Pacientes (n = 19)</i>	9,4 \pm 2,5	0,33	14,2 \pm 5,8	0,56	10,7 \pm 3,5	0,41
FPG						
<i>Controles (n = 27)</i>	25,3 \pm 3,2	-	57 \pm 2,6	-	34 \pm 5,2	-
<i>Pacientes (n = 19)</i>	25,6 \pm 4,6	0,96	75,1 \pm 19,8	0,11	38,1 \pm 8,6	0,86

P: Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (pacientes em relação aos controles)

4.3 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em pacientes com câncer de mama e controles

As distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos estudados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em pacientes (n=104) e controles (n=131) estão apresentadas na TABELA 14.

A análise do gene *CYP17* mostrou que as freqüências genótípicas do homozigoto selvagem (A1/A1), do heterozigoto (A1/A2) e do homozigoto mutante (A2/A2) foram respectivamente 38,5%, 42,3% e 19,2% para as mulheres com CM e 39,7%, 46,5% e 13,8% para os controles (TABELA 14). Essas freqüências não foram estatisticamente diferentes ($P=0,88$ para A1/A2 e $P=0,44$ para A2/A2, TABELA 14). Além disso, as freqüências alélicas para os

alelos A1 e A2 no grupo de pacientes foram, respectivamente, 0,597 e 0,403 e nos controles 0,629 e 0,371, estando assim em equilíbrio de Hardy-Weinberg (TABELA 17).

Nas TABELAS 14 e 15 estão os resultados da análise das freqüências genotípicas para o *CYP1B1*. Foi observado que, no grupo das pacientes 28,9% são homozigotas selvagens (Val/Val), 39,4% são heterozigotas (Val/Leu) e 31,7% homozigotas mutantes (Leu/Leu), enquanto que nos controles 22,9% são Val/Val, 63,3% Val/Leu e 13,8% Leu/Leu. Sendo assim, o genótipo heterozigoto foi significativamente mais freqüente no grupo controle do que no grupo de pacientes ($P=0,03$, OR:0,5; IC: 0,2-0,9). Ainda nesse mesmo *locus* foi observado que o homozigoto mutante foi mais freqüente nas pacientes (31,7%) do que nos controles (13,8%) porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,12$). As freqüências alélicas foram similares ($P= 0,43$) para pacientes e controles e estavam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (TABELA 17).

A análise dos dados apresentados nas TABELAS 14 e 16 mostra que as freqüências genotípicas do gene *CYP1A1* para o genótipo homozigoto selvagem (m1/m1) foi de 66,3% nas pacientes e 67,1% nos controles, do heterozigoto (m1/m2) foi de 28,9% nas pacientes e 27,5% nos controles e do homozigoto mutante (m2/m2) foi de 4,8% nas pacientes e 5,4% nos controles, ou seja, as distribuições genotípicas em pacientes e controles foram estatisticamente similares ($P=0,88$ e $P=0,9$ para m1/m2 e m2/m2, respectivamente, TABELA 16). Da mesma forma, as freqüências alélicas m1 e m2 para pacientes e controles foram muito semelhantes ($P=1,0$) e estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (TABELA 17).

Quanto ao gene *COMT*, observa-se nas TABELAS 14 e 16 que as freqüências para o genótipo homozigoto selvagem (Val/Val) foram 28,9% e 35,9% para pacientes e controles, respectivamente. Para o genótipo heterozigoto (Val/Met) não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre pacientes (57,7%) e controles (49,6%) ($P=0,24$), assim como para o genótipo homozigoto mutante (Met/Met) que esteve presente em 13,4% das pacientes e 14,5% dos controles ($P=0,83$) (TABELA 16). Também não foi observada nenhuma diferença

estatisticamente significativa com relação às freqüências dos alelos Val e Met em pacientes e controles ($P=0,7$, TABELA 17). Essa distribuição está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 14. Distribuição das freqüências genótípicas dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em mulheres com CM (pacientes) e mulheres controles.

LOCUS	GENÓTIPO	NÚMERO (%)	
		Pacientes (n = 104)	Controles (n = 131)
<i>CYP17</i>	A1/A1	40 (38,5)	52 (39,7)
	A1/A2	44 (42,3)	61 (46,5)
	A2/A2	20 (19,2)	18 (13,8)
<i>CYP1B1</i>	Val/Val	30 (28,9)	30 (22,9)
	Val/Leu	41 (39,4)	83 (63,3)
	Leu/Leu	33 (31,7)	18 (13,8)
<i>CYP1A1</i>	m1/m1	69 (66,3)	88 (67,1)
	m1/m2	30 (28,9)	36 (27,5)
	m2/m2	5 (4,8)	7 (5,4)
<i>COMT</i>	Val/Val	30 (28,9)	47 (35,9)
	Val/Met	60 (57,7)	65 (49,6)
	Met/Met	14 (13,4)	19 (14,5)

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1A1*→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante.

Tabela 15. Distribuição e comparação das freqüências genótípicas dos genes *CYP17* e *CYP1B1* em pacientes com CM e controles.

Grupo	GENÓTIPO					
	<i>CYP17</i>			<i>CYP1B1</i>		
	A1/A1	A1/A2	A2/A2	Val/Val	Val/Leu	Leu/Leu
Pacientes n = 104	40 (38,5)	44 (42,3)	20 (19,2)	30 (38,9)	41 (39,4)	33(31,7)
Controles n = 131	52 (39,7)	61 (46,5)	18 (13,8)	30 (22,9)	83 (63,3)	18 (13,8)
P		0,88	0,44		0,03*	0,12
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,9 (0,5 - 1,6)	1,4 (0,6 – 3,0)	1,0 (referência)	0,5 (0,2 - 0,9)	1,8 (0,8 – 3,9)

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança. *estatisticamente significativo

Tabela 16. Distribuição e comparação das freqüências genótípicas dos genes *CYP1A1* e *COMT* em pacientes com CM e controles.

Grupo	GENÓTIPO					
	<i>CYP1A1</i>			<i>COMT</i>		
	m1/m1	m1/m2	m2/m2	Val/Val	Val/Met	Leu/Met
Pacientes n = 104	69 (66,3)	30 (28,9)	5 (4,8)	30 (28,9)	60 (57,7)	14(13,4)
Controles n = 131	88 (67,1)	36 (27,5)	7 (5,4)	47 (35,9)	65 (49,6)	19 (14,5)
P		0,88	0,9		0,24	0,83
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,0 (0,6 - 1,8)	0,9 (0,3 – 3,0)	1,0 (referência)	1,4 (0,8 - 2,5)	1,1 (0,5 – 2,6)

CYP1A1→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 17. Frequências dos alelos selvagens e mutantes para os genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em pacientes com CM e controles.

	FREQUÊNCIA ALÉLICA							
	CYP17		CYP1B1		CYP1A1		COMT	
	A1	A2	Val	Leu	m1	m2	Val	Met
Pacientes	0,597	0,403	0,486	0,514	0,808	0,192	0,578	0,422
Controles	0,629	0,371	0,545	0,455	0,809	0,191	0,607	0,393
P	0,59		0,43		1,0		0,7	

A1, Val, m1: alelos selvagens; A2, Leu, m2, Met: alelos mutantes; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher

4.4 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em pacientes com CM e controles em relação à etnia

As freqüências dos genótipos referentes aos polimorfismos estudados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* no grupo de pacientes e no grupo controle foram correlacionadas com as diferentes etnias (TABELAS 18, 19, 20, 21 e 22).

Foi feita análise dos diferentes genótipos distribuídos entre as três principais etnias da população brasileira: brancos, pardos e negros. Na subdivisão dos grupos, alguns genótipos não foram observados dentro de determinados grupos étnicos, por exemplo, o genótipo A2/A2 (*CYP17*) que esteve ausente em pacientes e controles negros. Isso se deve ao tamanho amostral não ter sido grande o suficiente para que esses dados fossem obtidos. Dessa forma, não foi possível realizar a análise estatística nessas situações.

No entanto, a freqüência de alguns genótipos diferiu bastante entre pacientes e controles possivelmente porque as etnias parda e negra foram pouco representadas nos grupos estudados, o que possivelmente influenciou os resultados das análises estatísticas.

Também foram analisadas, comparativamente, as distribuições genotípicas dentro das diferentes etnias tanto no grupo de controles quanto no grupo de pacientes isoladamente.

Considerando-se as comparações entre as diferentes etnias dentro do grupo controle (TABELAS 19 e 20), pode-se constatar que as distribuições dos diferentes genótipos do *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* são semelhantes. Porém, dentro do grupo de negros o número amostral foi muito pequeno o que não possibilitou a detecção de indivíduos com os seguintes genótipos: A1/A2 e A2/A2 (*CYP17*) e Leu/Leu (*CYP1B1*).

Nas TABELAS 21 e 22 as comparações das distribuições genotípicas entre as diferentes etnias foi feita dentro do grupo de pacientes com CM. Os dados obtidos mostram que não existem diferenças estatisticamente consideráveis para nenhuma das etnias consideradas no que diz respeito às distribuições genotípicas dos polimorfismos aqui estudados. Também não foram

encontrados dentro do grupo étnico de negros indivíduos com os genótipos A2/A2 (*CYP17*) e m2/m2 (*CYP1A1*).

Tabela 18. Distribuição das freqüências genotípicas dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em pacientes com CM e controles em relação à etnia

LOCUS/ GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL(%)					
	BRANCOS		PARDOS		NEGROS	
	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles
<i>CYP17</i>						
A1/A1	29/84(34,5)	45/111(40,6)	6/13(46,2)	7/16(43,8)	5/7(71,4)	4/4(100)
A1/A2	38/84(45,2)	51/111(45,9)	4/13(30,7)	6/16(37,5)	2/7(28,6)	0/4(0)
A2/A2	17/84(20,3)	15/111(13,5)	3/13(23,1)	3/16(18,7)	0/7(0)	0/4(0)
<i>CYP1B1</i>						
Val/Val	20/84(23,8)	24/111(21,6)	6/13(46,2)	4/16(25)	4/7(57,1)	2/4(50)
Val/Leu	36/84(42,9)	71/111(64)	4/13(30,7)	10/16(62,5)	1/7(14,3)	2/4(50)
Leu/Leu	28/84(33,3)	16/111(14,4)	3/13(23,1)	2/16(12,5)	2/7(28,6)	0/4(0)
<i>CYP1A1</i>						
m1/m1	60/84(71,4)	76/111(68,5)	6/13(46,2)	10/16(62,5)	3/7(42,9)	2/4(50)
m1/m2	21/84(25)	30/111(27)	5/13(38,5)	5/16(31,2)	4/7(57,1)	1/4(25)
m2/m2	3/84(3,6)	5/111(4,5)	2/13(15,3)	1/16(6,3)	0/7(0)	1/4(25)
<i>COMT</i>						
Val/Val	26/84(31)	40/111(36)	2/13(15,3)	6/16(37,5)	2/7(28,6)	1/4(25)
Val/Met	47/84(56)	54/111(48,7)	9/13(69,4)	9/16(56,3)	4/7(57,1)	2/4(50)
Met/Met	11/84(13)	17/111(15,3)	2/13(15,3)	1/16(6,2)	1/7(14,3)	1/4(25)

CYP17→A1/A1: homozigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterozigoto; A2/A2: homozigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterozigoto; Leu/Leu: homozigoto para o alelo mutante; *CYP1A1*→m1/m1: homozigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterozigoto; m2/m2: homozigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterozigoto; Met/Met: homozigoto para o alelo mutante.

Tabela 19. Comparação entre as etnias das mulheres do grupo de controles em relação às frequências dos polimorfismos *CYP17* e *CYP1B1*

CONTROLES	GENÓTIPO					
	A1/A1	<i>CYP17</i> A1/A2	A2/A2	Val/Val	<i>CYP1B1</i> Val/Leu	Leu/Leu
Brancos (n = 111)	45 (40,6)	51 (45,9)	15 (13,5)	24 (21,6)	71 (64)	16 (14,4)
Pardos (n = 16)	7 (43,8)	6 (37,5)	3 (18,7)	4 (25)	10 (62,5)	2 (12,5)
P		0,76	0,7		0,75	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,3 (0,4-4,2)	0,7 (0,1-3,4)	1,0 (referência)	1,1 (0,3-4,1)	1,3 (0,2-8,1)
Brancos (n = 111)	45 (40,6)	51 (45,9)	15 (13,5)	24 (21,6)	71 (64)	16 (14,4)
Negros (n = 4)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0 (0)
P		-	-		0,28	-
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	--**	--**	1,0 (referência)	2,9 (0,4-22,1)	--**
Pardos (n = 16)	7 (43,8)	6 (37,5)	3 (18,7)	4 (25)	10 (62,5)	2 (12,5)
Negros (n = 4)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0 (0)
P		-	-		0,56	-
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	--**	--**	1,0 (referência)	2,5 (0,25-24,3)	--**

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança; **OR não calculada devido a um número insuficiente de indivíduos nesse grupo.

Tabela 20. Comparação entre as etnias das mulheres do grupo de controles em relação às frequências dos polimorfismos *CYP1A1* e *COMT*

CONTROLES	GENÓTIPO					
	m1/m1	<i>CYP1A1</i> m1/m2	m2/m2	Val/Val	<i>COMT</i> Val/Met	Met/Met
Branços (n =111)	76 (68,5)	30 (27)	5 (4,5)	40 (36)	54 (48,7)	17 (15,3)
Pardos (n =16)	10 (62,5)	5 (31,2)	1 (6,3)	6 (37,5)	9 (56,3)	1 (6,2)
P		0,76	0,55		1,0	0,6
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,7 (0,2-2,5)	0,6 (0,06-62)	1,0 (referência)	0,9 (0,3-2,7)	2,5 (0,2-22,8)
Branços (n =111)	76 (68,5)	30 (27)	5 (4,5)	40 (36)	54 (48,7)	17 (15,3)
Negros (n =4)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	1 (25)
P		1,0	0,2		1,0	0,52
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,7 (0,06-9)	0,1 (0,01-1,7)	1,0 (referência)	0,6 (0,05-7,7)	0,4 (0,02-7,2)
Pardos (n =16)	10 (62,5)	5 (31,2)	1 (6,3)	6 (37,5)	9 (56,3)	1 (6,2)
Negros (n =4)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	1 (25)
P		1,0	0,39		1,0	0,41
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1 (0,07-13,8)	0,2 (0,008-4,7)	1,0 (referência)	0,7 (0,05-10,2)	0,1 (0,005-5,4)

CYP1A1→m1/m1: homozigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterozigoto; m2/m2: homozigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterozigoto; Met/Met: homozigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 21. Comparação entre as etnias das mulheres do grupo de pacientes com CM em relação às freqüências dos polimorfismos *CYP17* e *CYP1B1*

PACIENTES	GENÓTIPO					
	A1/A1	<i>CYP17</i> A1/A2	A2/A2	Val/Val	<i>CYP1B1</i> Val/Leu	Leu/Leu
Brancos (n =84)	29 (34,5)	38 (45,2)	17 (20,3)	20 (23,8)	36 (42,9)	28 (33,3)
Pardos (n =13)	6 (46,2)	4 (30,7)	3 (23,1)	6 (46,1)	4 (30,7)	3 (23,1)
P		0,49	1,0		0,17	0,27
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,9 (0,5-7,6)	1,1 (0,25-5,3)	1,0 (referência)	2,7 (0,6-10)	2,8 (0,6-12,5)
Brancos (n =84)	29 (34,5)	38 (45,2)	17 (20,3)	20 (23,8)	36 (42,9)	28 (33,3)
Negros (n =7)	5 (71,4)	2 (28,6)	0 (0)	4 (57,1)	1 (14,3)	2 (28,6)
P		0,23	-		0,07	0,38
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	3,2 (0,6-18,1)	--**	1,0 (referência)	7,2 (0,7-68,9)	2,8 (0,4-16,8)
Pardos (n = 13)	6 (46,2)	4 (30,7)	3 (23,1)	6 (46,1)	4 (30,7)	3 (23,1)
Negros (n =7)	5 (71,4)	2 (28,6)	0 (0)	4 (57,1)	1 (14,3)	2 (28,6)
P		1,0	-		0,6	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,6 (0,2-13,2)	--**	1,0 (referência)	2,6 (0,2-33,5)	1,0 (0,1-8,9)

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança; **OR não calculada devido a um número insuficiente de indivíduos nesse grupo.

Tabela 22. Comparação entre as etnias das mulheres do grupo de pacientes com CM em relação às freqüências dos polimorfismos *CYP1A1* e *COMT*

PACIENTES	GENÓTIPO					
	<i>m1/m1</i>	<i>CYP1A1</i> <i>m1/m2</i>	<i>m2/m2</i>	<i>Val/Val</i>	<i>COMT</i> <i>Val/Met</i>	<i>Met/Met</i>
Brancos (n =84)	60 (71,4)	21 (84)	3 (3,6)	26 (31)	47 (56)	11 (13)
Pardos (n =13)	6 (46,2)	5 (38,5)	2 (15,3)	2 (15,3)	9 (69,4)	2 (15,3)
P		0,28	0,09		0,32	0,57
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,4 (0,1-1,5)	0,1 (0,02-1,0)	1,0 (referência)	0,4 (0,08-2,0)	0,4 (0,05-3,4)
Brancos (n =84)	60 (71,4)	21 (84)	3 (3,6)	26 (31)	47 (56)	11 (13)
Negros (n = 7)	3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0)	2 (28,6)	4 (57,1)	1 (14,3)
P		0,09	-		1,0	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,2 (0,05-1,2)	--**	1,0 (referência)	0,9 (0,1-5,2)	0,8 (0,06-10,3)
Pardos (n =13)	6 (46,2)	5 (38,5)	2 (15,3)	2 (15,3)	9 (69,4)	2 (15,3)
Negros (n =7)	3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0)	2 (28,6)	4 (57,1)	1 (14,3)
P		1,0	-		0,58	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,6 (0,09-4,2)	--**	1,0 (referência)	2,2 (0,2-22,1)	2,0 (0,09-44,3)

CYP1A1→*m1/m1*: homozigoto para o alelo selvagem; *m1/m2*: heterozigoto; *m2/m2*: homozigoto para o alelo mutante; *COMT*→*Val/Val*: homozigoto para o alelo selvagem; *Val/Met*: heterozigoto; *Met/Met*: homozigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança; **OR não calculada devido a um número insuficiente de indivíduos nesse grupo.

4.5 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em pacientes com CM e controles de acordo com o hábito tabagista

A amostra de controles apresentou 99 mulheres não-fumantes e 32 mulheres fumantes. No grupo de pacientes 59 mulheres eram não-fumantes e 18 mulheres fumantes. Foram excluídas da análise 27 pacientes para as quais não foram obtidos os dados referentes ao hábito tabagista.

Nas TABELAS 23 e 24 foi feita a comparação entre pacientes e controles não-fumantes e entre pacientes e controles fumantes, de acordo com os genótipos aqui estudados.

Pela análise da TABELA 23 observa-se que tanto no grupo de não-fumantes quanto no grupo de fumantes as distribuições genóticas do gene *CYP17* foram semelhantes quando se comparam pacientes e controles. Nessa mesma tabela, foi feita a análise dos diferentes genótipos do gene *CYP1B1* que mostrou, no grupo de não-fumantes, uma frequência estatisticamente maior do genótipo Leu/Leu nas pacientes (32,2%) do que nos controles (10,1%) ($P=0,04$). Em contrapartida, no grupo de fumantes, os controles (56,3%) apresentaram uma frequência significativamente maior do genótipo Val/Leu do que as pacientes (16,6%) ($P=0,01$). Os demais genótipos desse gene distribuíam-se de modo similar entre pacientes e controles, tanto no grupo de fumantes quanto no grupo de não-fumantes.

Quando é feita a análise das distribuições dos diferentes genótipos dos genes *CYP1A1* e *COMT* (TABELA 24), é possível detectar que no grupo de não-fumantes, pacientes e controles não tiveram diferenças nas distribuições dos genótipos em questão. Já no grupo de fumantes observou-se que, 38,9% das pacientes contra 18,8% dos controles apresentaram o genótipo m1/m2 (*CYP1A1*) porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,18$). O mesmo aconteceu para o genótipo heterozigoto Val/Met do gene *COMT*, que esteve presente em 61,1% das pacientes e 43,7% dos controles, também sem diferença estatisticamente significativa ($P=0,2$).

Tabela 23. Distribuição das pacientes com CM e dos controles em relação às freqüências genóticas dos genes *CYP17* e *CYP1B1* de acordo com o hábito tabagista.

GRUPO	GENÓTIPO					
	NÚMERO (%)					
	<i>CYP17</i>			<i>CYP1B1</i>		
	A1/A1	A1/A2	A2/A2	Val/Val	Val/Leu	Leu/Leu
Não fumantes						
Pacientes ^a (n=59)	25 (42,4)	25 (42,4)	9 (15,2)	15 (25,4)	25 (42,4)	19 (32,2)
Controles (n=99)	41 (41,4)	45 (45,5)	13 (13,1)	24 (24,2)	65 (65,7)	10 (10,1)
P		0,85	0,8		0,3	0,04*
OR (IC 95%)	1,0 referência	0,9 (0,4-1,8)	1,1 (0,4-3,0)	1,0 referência	0,6 (0,2-1,3)	3 (1,1-8,2)
Fumantes						
Pacientes ^a (n=18)	8 (44,5)	7 (38,9)	3 (16,6)	9 (50)	3 (16,6)	6 (33,4)
Controles (n=32)	11 (34,4)	16 (50)	5 (15,6)	6 (18,7)	18 (56,3)	8 (25)
P		0,52	1,0		0,01*	0,46
OR (IC 95%)	1,0 referência	0,6 (0,1-2,1)	0,8 (0,1-4,5)	1,0 referência	0,1 (0,02-0,5)	0,5 (0,1-2,1)

^aexcluíram-se 27 pacientes para os quais não foram obtidas essas informações

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança. *estatisticamente significativo

Tabela 24. Distribuição das pacientes com CM e dos controles em relação às freqüências genóticas dos genes *CYP1A1* e *COMT* de acordo com o hábito tabagista.

GRUPO	GENÓTIPO NÚMERO (%)					
		<i>CYP1A1</i>			<i>COMT</i>	
	m1/m1	m1/m2	m2/m2	Val/Val	Val/Met	Met/Met
Não fumantes						
Pacientes ^a (n=59)	36 (61)	20 (33,9)	3 (5,1)	20 (33,9)	30 (50,9)	9 (15,2)
Controles (n=99)	65 (65,7)	30 (30,3)	4 (4)	34 (34,3)	51 (51,5)	14 (14,4)
P		0,72	0,7		1,0	1,0
OR (IC 95%)	1,0 referência	1,2 (0,5-2,4)	1,3 (0,2-6,3)	1,0 referência	1 (0,4-2,0)	1 (0,4-2,9)
Fumantes						
Pacientes ^a (n=18)	10 (55,5)	7 (38,9)	1 (5,6)	4 (22,2)	11 (61,1)	3 (16,7)
Controles (n=32)	23 (71,9)	6 (18,8)	3 (9,3)	13 (40,7)	14 (43,7)	5 (16,6)
P		0,18	1,0		0,2	0,63
OR (IC 95%)	1,0 referência	2,6 (0,7-10)	0,7 (0,07-8,3)	1,0 referência	2,5 (0,6-10)	1,9 (0,3-12)

^aexcluíram-se 27 pacientes para os quais não foram obtidas essas informações.

CYP1A1→m1/m1: homozigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterozigoto; m2/m2: homozigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterozigoto; Met/Met: homozigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

4.6 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* em pacientes com CM e controles sadias de acordo com a idade da menarca e da menopausa

Para avaliar a associação entre a idade da menarca com os polimorfismos, as pacientes com CM e os controles foram separados em dois grupos, de acordo com a idade da menarca: i) idade da menarca menor ou igual (\leq) 13 anos, constituído de 45 pacientes e 78 controles; ii) idade da menarca maior ($>$) do que 13 anos constituído de 32 pacientes e 53 controles. Foram excluídas 27 mulheres do grupo de pacientes para as quais essa informação não foi obtida.

A primeira comparação foi feita entre pacientes e controles pertencentes a um mesmo grupo de idade menarca (TABELAS 25 e 26).

Na TABELA 25 é possível visualizar os dados referentes às distribuições genotípicas do gene *CYP17*; pacientes e controles apresentaram distribuições genotípicas similares tanto no grupo de idade menarca \leq 13 anos quanto no grupo $>$ 13 anos. Nessa mesma tabela, estão apresentadas as distribuições genotípicas do gene *CYP1B1*. No grupo de menarca \leq 13 anos, o genótipo Val/Leu esteve mais presente nos controles (66,7%) do que nas pacientes (22,3%) ($P < 0,01$). Já no grupo menarca $>$ 13 anos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Com relação às freqüências genotípicas dos genes *CYP1A1* e *COMT*, também não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa entre pacientes e controles em ambos os grupos (TABELA 26).

A segunda comparação foi feita entre menarca \leq 13 anos e menarca $>$ 13 anos de idade dentro do grupo de controles e de pacientes isoladamente.

As TABELAS 27 e 28 mostram que, no grupo de controles, as freqüências dos diferentes genótipos para os genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* não apresentaram associação com a idade da menarca.

Diferentemente daquilo que se esperava, de acordo com dados prévios apresentados na literatura, nas comparações feitas dentro da amostra populacional de pacientes não foi observada associação entre os genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 do gene *CYP17* com a idade da menarca. Por outro lado, o genótipo Val/Leu do gene *CYP1B1* foi mais freqüente no grupo de pacientes com menarca > 13 anos (56,2%) do que menarca ≤ 13 anos (22,3%) no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,06$) (TABELA 29).

Observando os dados apresentados na TABELA 30, também não é possível estabelecer associação entre os diferentes genótipos dos genes *CYP1A1* e *COMT* e a idade menarca no grupo de pacientes.

Também foi feita a análise da idade da menopausa considerando-se os diferentes polimorfismos estudados. Essa análise foi feita em 68 mulheres do grupo controle e 65 pacientes com CM. Vale ainda lembrar que no grupo de pacientes não constam 27 mulheres para as quais os dados referentes à idade da menopausa não foram obtidos.

Novamente foram feitos dois tipos de comparações. A primeira foi entre pacientes e controles de acordo com a idade da menopausa ser ≤ 45 anos ou > 45 anos de idade (TABELAS 31 e 32). A segunda foi feita comparando-se a idade da menarca dentro do grupo de controles e pacientes isoladamente (TABELAS 33, 34, 35 e 36).

Na TABELA 31, quanto aos polimorfismos estudados nos genes *CYP17* e *CYP1B1*, pode-se observar que não existe associação entre a idade da menopausa e os genótipos, quando comparados pacientes e controles. Isso também pode ser observado com relação aos genes *CYP1A1* e *COMT* (TABELA 32), cujos genótipos não se mostraram associados à idade da menopausa em pacientes e controles.

A análise feita no grupo de controles mostra que os diferentes genótipos do gene *CYP17* não influenciaram a idade da menopausa, diferentemente do que era esperado. O mesmo aconteceu com o gene *CYP1B1*, onde, apesar do genótipo Leu/Leu estar presente em 21,8% do grupo com idade ≤ 45 anos e 8,9% do grupo com idade > 45 anos, o mesmo não se

associou com a idade da menopausa nesse grupo (TABELA 33). Ainda considerando apenas os controles, os diferentes genótipos dos genes *CYP1A1* e *COMT* também não influenciaram a idade da menopausa (TABELA 34).

A análise dos dados apresentados nas TABELAS 35 e 36 mostram que dentro do grupo de pacientes com CM, nenhum dos polimorfismos estudados esteve associado com a idade da menopausa ser \leq ou $>$ 45 anos.

Tabela 25. Distribuição das pacientes com CM e dos controles em relação às freqüências genóticas dos genes *CYP1A1* e *COMT* de acordo com a idade menarca ≤ ou > 13 anos.

GRUPO	GENÓTIPO					
	A1/A1	A1/A2	A2/A2	Val/Val	Val/Leu	Leu/Leu
Menarca ≤ 13 anos						
Pacientes ^a (n=45)	20 (44,5)	18 (40)	7 (15,5)	18 (40)	10 (22,3)	17 (37,7)
Controles (n=78)	34 (43,6)	35 (44,9)	9 (11,5)	14 (17,9)	52 (66,7)	12 (15,4)
P		0,84	0,77		<0,01*	1,0
OR (IC 95%)	1,0 referência	0,8 (0,4-1,9)	1,3 (0,4-4,1)	1,0 referência	0,1 (0,05-0,4)	1,1 (0,4-3,0)
Menarca > 13 anos						
Pacientes ^a (n=32)	13 (40,6)	14 (43,7)	5 (15,7)	6 (18,8)	18 (56,2)	8 (25)
Controles (n=53)	18 (33,9)	26 (49,1)	9 (17)	16 (30,2)	31 (58,5)	6 (11,3)
P		0,62	0,75		0,59	0,09
OR (IC 95%)	1,0 referência	0,7 (0,2-1,9)	0,7 (0,2-2,8)	1,0 referência	1,5 (0,5-4,6)	3,5 (0,8-14,6)

^aexcluíram-se 27 pacientes para os quais não foram obtidas essas informações

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança. *estatisticamente significativo

Tabela 26. Distribuição das pacientes com CM e dos controles em relação às freqüências genóticas dos genes *CYP1A1* e *COMT* de acordo com a idade menarca \leq ou $>$ 13 anos.

GRUPO	GENÓTIPO NÚMERO (%)					
		<i>CYP1A1</i>			<i>COMT</i>	
	m1/m1	m1/m2	m2/m2	Val/Val	Val/Met	Met/Met
Menarca \leq 13 anos						
Pacientes ^a (n=45)	24 (53,3)	18 (40)	3 (6,7)	15 (33)	21 (47)	9(20)
Controles (n=78)	55 (70,5)	21 (26,9)	2 (2,6)	30 (38,4)	38 (48,7)	10 (12,9)
P		0,1	0,32		0,83	0,4
OR (IC 95%)	1,0 referência	1,9 (0,8-4,3)	3,4 (0,5-21,9)	1,0 referência	1,1 (0,4-2,5)	1,8 (0,6-5,3)
Menarca $>$ 13 anos						
Pacientes ^a (n=32)	22 (68,8)	9 (28,1)	1 (3,1)	9 (28,1)	20 (62,5)	3 (9,4)
Controles (n=53)	33 (62,3)	15 (28,3)	5 (9,4)	17(32,1)	27 (50,9)	9 (17)
P		1,0	0,4		0,61	0,71
OR (IC 95%)	1,0 referência	0,9 (0,3-2,4)	0,3 (0,03-2,7)	1,0 referência	1,4 (0,5-3,7)	0,6 (0,1-2,9)

^aexcluíram-se 27 casos para os quais não foram obtidas essas informações

CYP1A1→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 27. Comparação da idade menarca \leq ou $>$ 13 anos em mulheres controles em relação às freqüências dos genótipos *CYP17* e *CYP1B1*.

Controles	GENÓTIPO					
	A1/A1	<i>CYP17</i> A1/A2	A2/A2	Val/Val	<i>CYP1B1</i> Val/Leu	Leu/Leu
Menarca\leq13 anos (n = 78)	34 (43,6)	35 (44,9)	9 (11,5)	14 (17,9)	52 (66,7)	12 (15,4)
Menarca$>$13 anos (n = 53)	18 (33,9)	26 (49,1)	9 (17)	16 (30,2)	31 (58,5)	6 (11,3)
P		0,44	0,27		0,13	0,23
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,7 (0,3-1,5)	0,5 (0,1-1,5)	1,0 (referência)	1,9 (0,8-4,4)	2,2 (0,6-7,7)

CYP17→A1/A1: homozigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterozigoto; A2/A2: homozigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterozigoto; Leu/Leu: homozigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 28. Comparação da idade menarca \leq ou $>$ 13 anos em mulheres controles em relação às freqüências dos genótipos *CYP1A1* e *COMT*.

Controles	GENÓTIPO					
	m1/m1	<i>CYP1A1</i> m1/m2	m2/m2	Val/Val	<i>COMT</i> Val/Met	Met/Met
Menarca\leq13 anos (n = 78)	55 (70,5)	21 (26,9)	2 (2,6)	30 (38,4)	38 (48,7)	10 (12,9)
Menarca$>$13 anos (n = 53)	33 (62,3)	15 (28,3)	5 (9,4)	17 (32,1)	27 (50,9)	9 (17)
P		0,68	0,11		0,69	0,41
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,8 (0,3-1,8)	0,2 (0,04-1,3)	1,0 (referência)	0,8 (0,3-1,7)	0,6 (0,2-1,8)

CYP1A1→m1/m1: homozigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterozigoto; m2/m2: homozigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterozigoto; Met/Met: homozigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 29. Comparação da idade menarca \leq ou $>$ 13 anos em pacientes com câncer de mama em relação às frequências dos genótipos *CYP17* e *CYP1B1*.

Pacientes*	GENÓTIPO					
	A1/A1	<i>CYP17</i> A1/A2	A2/A2	Val/Val	<i>CYP1B1</i> Val/Leu	Leu/Leu
Menarca\leq13 anos (n =45)	20 (44,5)	18 (40)	7 (15,5)	18 (40)	10 (22,3)	17 (37,7)
Menarca$>$13 anos (n =32)	13 (40,6)	14 (43,7)	5 (15,7)	6 (18,8)	18 (56,2)	8 (25)
P		0,8	1,0		0,06	0,75
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,8 (0,3-2,2)	0,9 (0,2-3,4)	1,0 (referência)	0,1 (0,05-0,6)	0,7 (0,2-2,4)

^aexcluíram-se 27 pacientes para as quais não foram obtidas essas informações

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança. *estatisticamente significativo

Tabela 30. Comparação da idade menarca \leq ou $>$ 13 anos em pacientes com câncer de mama em relação às frequências dos genótipos *CYP1A1* e *COMT*.

Pacientes*	GENÓTIPO					
	m1/m1	<i>CYP1A1</i> m1/m2	m2/m2	Val/Val	<i>COMT</i> Val/Met	Met/Met
Menarca\leq13 anos (n =45)	24 (53,5)	18 (40)	3 (6,7)	15 (33)	21 (47)	9 (20)
Menarca$>$13 anos (n = 32)	22 (68,8)	9 (28,1)	1 (3,1)	9 (28,1)	20 (62,5)	3 (9,4)
P		0,32	0,61		0,44	0,7
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,8 (0,7-4,9)	2,7(0,2-28,4)	1,0 (referência)	0,6 (0,2-1,7)	1,8 (0,3-8,4)

^aexcluíram-se 27 pacientes para os quais não foram obtidas essas informações

CYP1A1→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 31. Distribuição das pacientes com CM e dos controles em relação às freqüências genóticas dos genes *CYP1A1* e *COMT* de acordo com a idade da menopausa \leq ou $>$ 45 anos.

GRUPO	GENÓTIPO NÚMERO (%)					
	A1/A1	CYP17		Val/Val	CYP1B1	
		A1/A2	A2/A2		Val/Leu	Leu/Leu
Menopausa \leq 45 anos						
Pacientes ^a (n=20)	6 (30)	9 (45)	5 (25)	5 (25)	9 (45)	6 (30)
Controles (n=23)	10 (43,5)	10 (43,5)	3 (13)	3 (13)	15 (65,2)	5 (21,8)
P		0,73	0,4		0,25	1,0
OR (IC 95%)	1,0 referência	1,5 (0,3-5,8)	2,7 (0,4-16)	1,0 referência	0,3 (0,06-1,8)	0,7 (0,1-4,6)
Menopausa $>$45 anos						
Pacientes ^a (n=35)	17 (48,6)	14 (40)	4 (11,4)	10 (28,6)	15 (42,8)	10 (28,6)
Controles (n=45)	15 (34)	23 (51)	7 (15)	13 (28,9)	28 (62,2)	4 (8,9)
P		0,23	0,48		0,6	0,17
OR (IC 95%)	1,0 referência	0,5 (0,2-1,4)	0,5 (0,1-2,0)	1,0 referência	0,7 (0,2-1,9)	3,2 (0,7-13,4)

^aexcluíram-se 27 pacientes para os quais não foram obtidas essas informações

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 32. Distribuição das pacientes com CM dos controles em relação às freqüências genóticas dos genes *CYP1A1* e *COMT* de acordo com a idade da menopausa ≤ ou > 45 anos.

GRUPO	GENÓTIPO NÚMERO (%)					
		<i>CYP1A1</i>			<i>COMT</i>	
	m1/m1	m1/m2	m2/m2	Val/Val	Val/Met	Met/Met
Menopausa ≤ 45 anos						
Pacientes ^a (n=20)	12 (60)	7 (35)	1 (5)	7 (35)	10 (50)	3 (15)
Controles (n=23)	15 (65,2)	7 (30,4)	1 (4,4)	7 (30,4)	15 (65,2)	1 (4,4)
P		0,75	1,0		0,73	0,58
OR (IC 95%)	1,0 referência	1,2 (0,3-4,5)	1,2 (0,07-22,1)	1,0 referência	0,7 (0,1-2,4)	3 (0,2-36,3)
Menarca > 45 anos						
Pacientes ^a (n=35)	23 (65,7)	11 (31,4)	1 (2,9)	12 (34,3)	19 (54,3)	4 (11,4)
Controles (n=45)	31 (68,9)	12 (26,6)	2 (4,5)	18 (40)	21 (46,7)	6 (13,3)
P		0,8	1,0		0,34	0,30
OR (IC 95%)	1,0 referência	1,2 (0,4-3,2)	0,7 (0,05-7,9)	1,0 referência	0,6 (0,2-1,5)	0,4 (0,1-1,9)

^aexcluíram-se 27 pacientes para os quais não foram obtidas essas informações

CYP1A1→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 33. Comparação da idade da menopausa \leq ou $>$ 45 anos em mulheres controles em relação às freqüências dos genótipos *CYP17* e *CYP1B1*.

Controles	GENÓTIPO					
	<i>A1/A1</i>	<i>CYP17</i> <i>A1/A2</i>	<i>A2/A2</i>	<i>Val/Val</i>	<i>CYP1B1</i> <i>Val/Leu</i>	<i>Leu/Leu</i>
Menopausa\leq45 anos (n =23)	10 (43,5)	10 (43,5)	3 (13)	3 (13)	15 (65,2)	5 (21,8)
Menopausa$>$45 anos (n =45)	15 (34)	23 (51)	7 (15)	13 (28,9)	28 (62,2)	4 (8,9)
P		0,6	0,7		0,34	0,18
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,6 (0,-1,9)	0,6 (0,1-3,0)	1,0 (referência)	2,3 (0,5-9,4)	4,3 (0,7-25,3)

CYP17→*A1/A1*: homocigoto para o alelo selvagem; *A1/A2*: heterocigoto; *A2/A2*: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→*Val/Val*: homocigoto para o alelo selvagem; *Val/Leu*: heterocigoto; *Leu/Leu*: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 34. Comparação da idade da menopausa \leq ou $>$ 45 anos em mulheres controles em relação às freqüências dos genótipos *CYP1A1* e *COMT*.

Controles	GENÓTIPO					
	<i>m1/m1</i>	<i>CYP1A1</i> <i>m1/m2</i>	<i>m2/m2</i>	<i>Val/Val</i>	<i>COMT</i> <i>Val/Met</i>	<i>Met/Met</i>
Menopausa\leq45 anos (n =23)	15 (65,2)	7 (30,4)	1 (4,4)	7 (30,4)	15 (65,2)	1 (4,4)
Menopausa$>$45 anos (n = 45)	31 (68,9)	12 (26,6)	2 (4,5)	18 (40)	21 (46,7)	6 (13,3)
P		0,77	1,0		0,3	0,64
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,2 (0,4-3,7)	1,0 (0,08-12,3)	1,0 (referência)	1,8 (0,6-5,4)	0,4 (0,04-4,2)

CYP1A1→*m1/m1*: homocigoto para o alelo selvagem; *m1/m2*: heterocigoto; *m2/m2*: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→*Val/Val*: homocigoto para o alelo selvagem; *Val/Met*: heterocigoto; *Met/Met*: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 35. Comparação da idade da menopausa \leq ou $>$ 45 anos em pacientes com câncer de mama em relação às frequências dos genótipos *CYP17* e *CYP1B1*.

Pacientes ^a	GENÓTIPO					
	A1/A1	<i>CYP17</i> A1/A2	A2/A2	Val/Val	<i>CYP1B1</i> Val/Leu	Leu/Leu
Menopausa\leq45 anos (n =20)	6 (30)	9 (45)	5 (25)	5 (25)	9 (45)	6 (30)
Menopausa$>$45 anos (n = 35)	17 (48,6)	14 (40)	4 (11,4)	10 (28,6)	15 (42,8)	10 (28,6)
P		0,53	0,21		1,0	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,8 (0,5-6,3)	3,5 (0,7-17,7)	1,0 (referência)	1,2 (0,3-4,6)	1,2 (0,3-5,2)

^aexcluíram-se 27 pacientes para as quais não foram obtidas essas informações

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

Tabela 36. Comparação da idade da menopausa \leq ou $>$ 45 anos em pacientes com câncer de mama em relação às frequências dos genótipos *CYP1A1* e *COMT*.

Pacientes ^a	GENÓTIPO					
	m1/m1	<i>CYP1A1</i> m1/m2	m2/m2	Val/Val	<i>COMT</i> Val/Met	Met/Met
Menopausa\leq45 anos (n =20)	12 (60)	7 (35)	1 (5)	7 (35)	10 (50)	3 (15)
Menopausa$>$45 anos (n =35)	23 (65,7)	11 (31,4)	1 (2,9)	12 (34,3)	19 (54,3)	4 (11,4)
P		0,7	1,0		1,0	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,2 (0,4-3,9)	1,9 (0,1-33,4)	1,0 (referência)	0,9 (0,2-3,0)	1,2 (0,2-7,5)

^aexcluíram-se 27pacientes para as quais não foram obtidas essas informações

CYP1A1→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança.

4.7 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* de acordo com os diferentes marcadores tumorais obtidos no grupo de mulheres com CM

O estudo da associação dos polimorfismos com os diferentes marcadores tumorais obtidos pela análise histo-patológica das amostras tumorais foi feito porque esses marcadores podem indicar um prognóstico desfavorável durante a evolução da doença.

De acordo com os dados apresentados na TABELA 37 o polimorfismo estudado no gene *CYP17* não mostrou nenhum tipo de associação com os marcadores tumorais obtidos. O genótipo Leu/Leu, referente ao gene *CYP1B1*, foi significativamente mais freqüente em pacientes com positividade para os receptores de estrógeno e progesterona ($P=0,01$) (OR= 5,2 e 4,3, respectivamente).

Na TABELA 38 observam-se as distribuições dos polimorfismos estudados nos genes *CYP1A1* e *COMT* em relação aos diferentes marcadores tumorais. Não houve relação entre os diferentes polimorfismos e os marcadores tumorais, salvo para o genótipo m1/m2 do gene *CYP1A1* significativamente mais freqüente nas pacientes com positividade para o marcador Cerb-B2 ($P=0,03$, OR=2,8).

Tabela 37. Comparação dos marcadores tumorais em pacientes com CM em relação às freqüências dos genótipos *CYP17* e *CYP1B1*.

MARCADOR TUMORAL	GENÓTIPO NÚMERO (%)					
	A1/A1	<i>CYP17</i>		Val/Val	<i>CYP1B1</i>	
		A1/A2	A2/A2		Val/Leu	Leu/Leu
Receptor de Estrógeno						
Positivo (n=65)	26(40)	26(40)	13(20)	15(23)	24(37)	26(50)
Negativo (n=32)	10(31,2)	16(50)	6(18,8)	12(37,5)	16(50)	4(12,5)
P		0,47	0,76		0,8	0,01*
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,6 (0,2-1,6)	0,8 (0,2-2,8)	1,0 (referência)	1,2 (0,4-3,2)	5,2 (1,4-19,0)
Receptor de Progesterona						
Positivo (n=56)	24(42,9)	23(41)	9(16,1)	13(23,2)	19(33,9)	24 (42,9)
Negativo (n=41)	12(29,3)	19(46,3)	10(24,4)	14(34,1)	21(51,2)	6(14,7)
P		0,35	0,24		1,0	0,01*
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,6 (0,2-1,5)	0,4 (0,1-1,4)	1,0 (referência)	0,9 (0,3-2,6)	4,3 (1,3-13,8)
P53						
Positivo (n=29)	11(37,9)	11(37,9)	7(24,2)	11(37,9)	13(44,8)	5(17,3)
Negativo (n=51)	16(31,4)	25 (49)	10(19,6)	12(23,5)	21(41,2)	18(35,3)
P		0,43	1,0		0,58	0,12
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	0,6 (0,2-1,8)	1 (0,3-3,5)	1,0 (referência)	0,6 (0,2-1,9)	0,3 (0,08-1,0)
Cerb-B2						
Positivo (n=34)	13(38,3)	16(47)	5(14,7)	9 (26,5)	14(41,2)	11(32,3)
Negativo (n=66)	24(36,4)	26(39,4)	16(24,2)	19(28,8)	27(40,9)	20(30,3)
P		0,81	0,55		1,0	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,1 (0,4-2,8)	0,5 (0,1-1,9)	1,0 (referência)	1,0 (0,4-3,0)	1,1 (0,4-3,4)

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança. *estatisticamente significativo

Tabela 38. Comparação dos marcadores tumorais em pacientes com CM em relação às freqüências dos genótipos *CYP1A1* e *COMT*.

MARCADOR TUMORAL	GENÓTIPO					
	<i>m1/m1</i>	<i>CYP1A1</i> <i>m1/m2</i>	<i>m2/m2</i>	Val/Met	<i>COMT</i> Val/Met	Met/Met
Receptor de Estrógeno						
Positivo (n=65)	40(61,5)	22(33,9)	3(4,6)	18(27,7)	39(60)	8(12,3)
Negativo (n=32)	24(75)	7(21,8)	1(3,2)	9(28,1)	18(56,2)	5(15,7)
P		0,24	1,0		1,0	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,8 (0,7-5,0)	1,8 (0,1-18,3)	1,0 (referência)	1,0 (0,4-2,8)	0,8 (0,2-3,1)
Receptor de Progesterona						
Positivo (n=56)	36(64,3)	18(32,1)	2(3,6)	16(28,6)	34(60,7)	6(10,7)
Negativo (n=41)	28(68,3)	11(26,8)	2(4,9)	11(26,8)	23(56,1)	7(17,1)
P		0,65	1,0		1,0	0,5
OR (IC 95%)	1,0 (referencia)	1,2 (0,5-3,1)	0,7 (0,1-5,8)	1,0 (referência)	1,0 (0,4-2,5)	0,5 (0,1-2,2)
P53						
Positivo (n=29)	18(62)	10(34,5)	1(3,5)	6(20,7)	16(55,2)	7(24,1)
Negativo (n=51)	35(68,7)	14(27,4)	2(3,9)	16(31,3)	30(58,9)	5(9,8)
P		0,6	1,0		0,59	0,13
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	1,3 (0,5-3,6)	0,9 (0,08-11,1)	1,0 (referência)	1,4 (0,4-4,3)	3,7 (0,8-16,4)
Cerb-B2						
Positivo (n=34)	18(52,9)	15(44,1)	1(3)	9(26,4)	21(61,8)	4(11,8)
Negativo (n=66)	48(72,8)	14(21,2)	4(6)	20(30,3)	36(54,5)	10(15,2)
P		0,03*	1,0		0,63	1,0
OR (IC 95%)	1,0 (referência)	2,8 (1,1-7,0)	0,6 (0,06-6,3)	1,0 (referência)	1,2 (0,5-3,3)	0,8 (0,2-3,6)

CYP1A1→*m1/m1*: homozigoto para o alelo selvagem; *m1/m2*: heterozigoto; *m2/m2*: homozigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterozigoto; Met/Met: homozigoto para o alelo mutante; P: os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança. *estatisticamente significativo

4.8 Análise da extensão dos níveis basais de lesões no DNA detectada pelo teste do micronúcleo e pelo Ensaio Cometa de acordo com os diferentes polimorfismos analisados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT*

Foi feita análise combinada entre os diferentes genótipos estudados e as lesões detectadas no DNA da população estudada a fim de avaliar uma possível influência dos polimorfismos genéticos aqui estudados sobre as médias de MN e dos danos detectados pelo Ensaio Cometa. Independentemente do genótipo considerado, o grupo de pacientes com CM sempre apresentou danos no DNA significativamente maiores do que o grupo controle. Sendo assim, as comparações das lesões no DNA em grupo de mulheres com diferentes genótipos foram feitas considerando-se separadamente controles e pacientes com CM.

As TABELAS 39 e 40 mostram o efeito dos diferentes polimorfismos estudados sobre as médias de MN.

Nenhum dos genótipos do gene *CYP17* esteve associado aos valores médios de MN observados tanto no grupo de pacientes com CM quanto nos controles (TABELA 39). Em contrapartida, foi observado no grupo controle, que mulheres com genótipo Val/Leu ou Leu/Leu apresentaram uma média significativamente maior de MN do que mulheres Val/Val; no entanto, o mesmo não foi observado no grupo de pacientes, onde as médias de MN são estatisticamente similares em todos os genótipos do gene *CYP1B1* aqui estudados.

Com relação ao gene *CYP1A1*, no grupo controle, embora as mulheres com genótipo m2/m2 tenham apresentado uma média maior de MN do que as mulheres m1/m1, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,43$). No grupo de pacientes com CM, apenas uma mulher apresentou o genótipo m2/m2, o que impossibilitou a inclusão desse genótipo na análise estatística desse grupo. Ainda com relação ao gene *CYP1A1* no grupo de pacientes, não houve diferença entre as médias de MN do grupo de mulheres m1/m1 e m1/m2 (TABELA 40).

A análise dos diferentes genótipos do gene *COMT* mostrou que, dentro do grupo controle, mulheres Val/Met e Met/Met apresentaram valores médios de MN significativamente menores do que mulheres Val/Val. Por outro lado, no grupo de pacientes com CM, mulheres Val/Met e Met/Met, apresentaram valores médios de MN maiores do que o grupo de mulheres Val/Val, no entanto essa diferença foi estatisticamente significativa apenas no grupo Met/Met ($P=0,04$) (TABELA 40).

Também foi feita a análise da influência dos diferentes polimorfismos estudados sobre a média de MN levando-se em consideração o hábito tabagista. Para isso, mulheres com CM e controles foram analisadas isoladamente.

A TABELA 41 mostra que os valores médios de MN não são estatisticamente diferentes quando se compararam não-fumantes e fumantes do grupo controle em relação ao genótipo.

No grupo de pacientes (TABELA 42) observou-se que, de modo geral, fumantes apresentaram valores médios de MN maiores do que não-fumantes, porém não há diferença nos valores médios de MN quando a amostra é classificada de acordo com os genótipos estudados.

As TABELAS 43, 44, 45 e 46 mostram as lesões no DNA detectadas pelo Ensaio Cometa de acordo com os diferentes polimorfismos estudados.

A TABELA 43 mostra que os valores médios da % de DNA na cauda, sobre o (Tail Moment) TM e o OTM (Olive Tail Moment) na cauda não são estatisticamente diferentes para cada um dos genótipos do gene *CYP17* no grupo controle. No entanto, no grupo de pacientes com CM, as mulheres com genótipo A1/A2 apresentaram uma média significativamente menor de TM do que as mulheres A1/A ($P=0,03$).

Com relação ao gene *CYP1B1* (TABELA 44), observou-se que no grupo controle, mulheres Val/Leu apresentaram valor médio de TM significativamente maior do que mulheres

Val/Val ($P=0,03$). No grupo de pacientes com CM, nenhum dos genótipos do gene *CYP1B1* influenciou os valores médios da % de DNA na cauda, do TM e do OTM.

Por fim, os valores médios da % de DNA, do TM e do OTM, tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes, não foi estatisticamente diferente quando considerados os polimorfismos nos genes *CYP1A1* e *COMT* (TABELAS 45 e 46).

Tabela 39. Média \pm Erro Padrão do número micronúcleos (MN) em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e de mulheres controles em relação aos diferentes genótipos dos genes *CYP17* e *CYP1B1*. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

GRUPO GENÓTIPOS <i>CYP17</i>	MN/1000 CBN Média \pm EP	P	GRUPO GENÓTIPOS <i>CYP1B1</i>	MN/1000CBN Média \pm EP	P
Controles (n=85)			Controles (n=85)		
A1/A1 (n=33)	10,3 \pm 1,2	-	Val/Val (n=20)	7,4 \pm 1	-
A1/A2 (n=39)	9,9 \pm 0,8	0,74	Val/Leu (n=53)	10,6* \pm 0,8	0,02
A2/A2 (n=13)	10,3 \pm 2	0,99	Leu/Leu (n=12)	14,5* \pm 2,6	<0,01
A1/A2;A2/A2 (n=52)	10,5 \pm 0,8	0,55	Val/Leu;Leu/Leu (n=65)	11,3* \pm 0,8	<0,01
Pacientes (n=45)			Pacientes (n=45)		
A1/A1 (n=20)	24,4 \pm 1,7	-	Val/Val (n=15)	23 \pm 2,8	-
A1/A2 (n=18)	21,5 \pm 2,4	0,24	Val/Leu (n=16)	22,5 \pm 1,6	0,89
A2/A2 (n=7)	23,7 \pm 5	0,79	Leu/Leu (n=14)	24 \pm 2,8	0,8
A1/A2;A2/A2 (n=25)	22 \pm 2,1	0,25	Val/Leu;Leu/Leu (n=30)	23,2 \pm 1,5	0,95

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (em relação ao genótipo selvagem do mesmo grupo). CBN: células binucleadas; *CYP17*→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante. *estatisticamente significativo

Tabela 40. Média \pm Erro Padrão do número de micronúcleos (MN) em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e de mulheres controles em relação aos diferentes genótipos dos genes *CYP1A1* e *COMT*. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

Grupo GENÓTIPOS <i>CYP1A1</i>			Grupo GENÓTIPOS <i>COMT</i>		
MN/1000 CBN			MN/1000 CBN		
	Média \pm EP	P		Média \pm EP	P
Controles (n=85)			Controles (n=85)		
m1/m1 (n=54)	10,5 \pm 0,8	-	Val/Val (n=28)	13 \pm 1,4	-
m1/m2 (n=26)	9,5 \pm 5	0,47	Val/Met (n=44)	9,3* \pm 0,7	0,02
m2/m2 (n=5)	14 \pm 4,3	0,43	Met/Met (n=13)	8,4* \pm 1,3	0,03
m1/m2;m2/m2 (n=31)	10,2 \pm 1,1	0,71	Val/Met;Met/Met (n=57)	9,1* \pm 0,7	0,01
Pacientes (n=45)			Pacientes (n=45)		
m1/m1 (n=29)	23,4 \pm 1,7	-	Val/Val (n=14)	19 \pm 2,2	-
m1/m2 (n=15)	23,3 \pm 2,7	0,97	Val/Met (n=25)	24,5 \pm 2	0,07
m2/m2 (n=1)	13 \pm nd	nd	Met/Met (n=6)	27,1* \pm 2,5	0,04
m1/m2;m2/m2 (n=16)	22,6 \pm 2,5	0,8	Val/Met;Met/Met (n=31)	25* \pm 1,7	0,03

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (em relação ao genótipo selvagem do mesmo grupo); CBN: células binucleadas; *CYP1A1*→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante. *estatisticamente significativo

Tabela 41. Média \pm Erro Padrão de micronúcleos (MN), distribuídos entre os diferentes genótipos dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* no grupo controle de acordo com o hábito tabagista.

GENÓTIPOS	NÃO-FUMANTES(n=66)		FUMANTES(n=19)		Valor de <i>P</i>
	MN/1000 CBN		MN/1000 CBN		
	N	Média \pm EP	N	Média \pm EP	
<i>CYP17</i>					
A1/A1	28	10,2 \pm 1,4	5	10,6 \pm 2,6	0,69
A1/A2	30	10 \pm 1	9	9,6 \pm 1,7	0,93
A2/A2	8	12 \pm 2	5	12,6 \pm 4,6	0,89
A1/A2;A2/A2	38	10,4 \pm 0,8	14	10,7 \pm 1,9	0,94
<i>CYP1B1</i>					
Val/Val	15	6,5 \pm 0,8	5	10,4 \pm 2,8	0,09
Val/Leu	45	10,9 \pm 0,9	8	8,9 \pm 1,6	0,5
Leu/Leu	6	15,7 \pm 4	6	13,4 \pm 3,8	0,69
Val/Leu;Leu/Leu	51	11,5 \pm 0,9	14	10,8 \pm 1,8	0,73
<i>CYP1A1</i>					
m1/m1	41	10,1 \pm 0,9	13	11,7 \pm 2,1	0,66
m1/m2	23	9,6 \pm 1,2	3	9 \pm 5,2	0,74
m2/m2	2	23 \pm 6	3	8 \pm 4,7	0,2
m1/m2;m2/m2	25	10,6 \pm 1,4	6	8,5 \pm 1,4	0,78
<i>COMT</i>					
Val/Val	21	12,6 \pm 1,6	7	14,6 \pm 3,3	0,55
Val/Met	36	9,7 \pm 1	8	7,9 \pm 1,2	0,64
Met/Met	9	8 \pm 1,5	4	9,5 \pm 2,3	0,49
Val/Met;Met/Met	45	9,3 \pm 5,8	12	8,4 \pm 1,1	0,88

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (fumantes em relação a não-fumantes de mesmo genótipo). CBN: células binucleadas; *CYP17*→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1A1*→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante.

Tabela 42. Média \pm Erro Padrão de micronúcleos (MN), distribuídos entre os diferentes genótipos dos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* no grupo de pacientes com CM de acordo com o hábito tabagista.

GENÓTIPOS	NÃO-FUMANTES		FUMANTES		Valor de <i>P</i>
	MN/1000 CBN		MN/1000 CBN		
	N	Média \pm EP	N	Média \pm EP	
<i>CYP17</i>					
A1/A1	15	23,6 \pm 1,6	5	26,8 \pm 5	0,43
A1/A2	15	19,8 \pm 1,9	3	29,3 \pm 10,8	0,14
A2/A2	4	23 \pm 5,8	3	24,6 \pm 10,4	0,88
A1/A2;A2/A2	19	20,5 \pm 1,9	6	27 \pm 6,8	0,42
<i>CYP1B1</i>					
Val/Val	9	20,5 \pm 2,3	6	26,6 \pm 6,5	0,72
Val/Leu	15	22,4 \pm 1,8	5	27,2 \pm 5,4	0,54
Leu/Leu	10	22,3 \pm 3	4	28,2 \pm 6,8	0,36
Val/Leu;Leu/Leu	25	22,3 \pm 1,5	9	27,6 \pm 3,9	0,28
<i>CYP1A1</i>					
m1/m1	23	22,2 \pm 1,5	6	27,8 \pm 5,9	0,31
m1/m2	11	21,1 \pm 2,5	4	29 \pm 7,1	0,2
m2/m2	0	--	1	13*	-
m1/m2;m2/m2	11	21,1 \pm 2,5	5	25,8 \pm 6,4	0,42
<i>COMT</i>					
Val/Val	11	17,9 \pm 1,8	3	23 \pm 8,6	0,36
Val/Met	18	23,3 \pm 2	7	27,1 \pm 5,5	0,56
Met/Met	5	25,2 \pm 1,9	1	---	-
Val/Met;Met/Met	23	23,8 \pm 1,6	8	28,3 \pm 4,8	0,35

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (fumantes em relação a não-fumantes de mesmo genótipo). CBN: células binucleadas; *CYP17*→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1B1*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterocigoto; Leu/Leu: homocigoto para o alelo mutante; *CYP1A1*→m1/m1: homocigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterocigoto; m2/m2: homocigoto para o alelo mutante; *COMT*→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante. * não foi possível obter o valor de P devido ao tamanho amostral.

Tabela 43. Média \pm Erro Padrão da % de DNA na cauda, do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e mulheres controles em relação aos diferentes genótipos do gene *CYP17*. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Grupo GENÓTIPOS <i>CYP17</i>	%DNA		TM		OTM	
	Média \pm EP	<i>P</i>	Média \pm EP	<i>P</i>	Média \pm EP	<i>P</i>
Controles (n=77)						
A1/A1 (n=34)	3,9 \pm 0,3	-	2,8 \pm 0,7	-	3,4 \pm 0,3	-
A1/A2 (n=33)	4,1 \pm 0,3	0,57	2,5 \pm 0,9	0,83	3,5 \pm 0,3	0,47
A2/A2 (n=10)	3,8 \pm 0,2	0,87	1,9 \pm 0,8	0,52	3,1 \pm 0,4	0,92
A1/A2;A2/A2 (n=43)	4 \pm 0,2	0,56	2,3 \pm 0,5	0,68	3,4 \pm 0,3	0,53
Pacientes (n=40)						
A1/A1 (n=17)	6,4 \pm 0,6	-	7,6 \pm 1,8	-	6,7 \pm 0,8	-
A1/A2 (n=19)	4,8 \pm 0,6	0,07	3,8* \pm 0,7	0,03	4,6 \pm 0,6	0,57
A2/A2 (n=4)	4,2 \pm 1,8	0,19	5,4 \pm 4,2	0,26	3,9 \pm 2	0,18
A1/A2;A2/A2 (n=23)	4,7 \pm 2,6	0,06	4* \pm 4,8	0,03	4,4* \pm 3	0,04

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (em relação ao genótipo selvagem do mesmo grupo).

CYP17→A1/A1: homocigoto para o alelo selvagem; A1/A2: heterocigoto; A2/A2: homocigoto para o alelo mutante. *estatisticamente significativo

Tabela 44. Média \pm Erro Padrão da % de DNA na cauda, do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e mulheres controles em relação aos diferentes genótipos do gene *CYP1B1*. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Grupo	%DNA		TM		OTM	
	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P
Controles (n=77)						
Val/Val (n=18)	3,4 \pm 0,2	-	0,98 \pm 0,2	-	2,7 \pm 0,2	-
Val/Leu (n=51)	4,2 \pm 0,2	0,29	3,1* \pm 0,6	0,03	3,6 \pm 0,3	0,26
Leu/Leu (n=8)	4 \pm 0,4	0,29	2,2 \pm 0,6	0,25	3,4 \pm 0,4	0,17
Val/Leu;Leu/Leu (n=59)	4,1 \pm 0,2	0,26	3* \pm 0,5	0,03	3,6 \pm 0,2	0,21
Pacientes (n=40)						
Val/Val (n=11)	6 \pm 1	-	6 \pm 1,7	-	6,1 \pm 1,1	-
Val/Leu (n=16)	4,3 \pm 0,3	0,28	3,8 \pm 1,2	0,2	4,1 \pm 0,5	0,24
Leu/Leu (n=13)	6,4 \pm 0,8	0,75	7,4 \pm 2,1	0,68	6,4 \pm 1	0,84
Val/Leu;Leu/Leu (n=29)	5,2 \pm 0,4	0,46	5,4 \pm 1,2	0,22	5,1 \pm 0,5	0,43

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (em relação ao genótipo selvagem do mesmo grupo).

CYP1B1→Val/Val: homozigoto para o alelo selvagem; Val/Leu: heterozigoto; Leu/Leu: homozigoto para o alelo mutante. *estatisticamente significativo

Tabela 45. Média \pm Erro Padrão da % de DNA na cauda, do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e mulheres controles em relação aos diferentes genótipos do gene *CYP1A1*. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Grupo	%DNA		TM		OTM	
	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P
Controles (n=77)						
m1/m1 (n=49)	4 \pm 0,2	-	2,7 \pm 0,5	-	3,5 \pm 0,3	-
m1/m2 (n=23)	3,9 \pm 0,4	0,43	2,4 \pm 0,7	0,75	3,3 \pm 0,4	0,62
m2/m2 (n=5)	4,2 \pm 0,8	0,86	1,3 \pm 0,8	0,27	2,9 \pm 0,7	0,45
m1/m2;m2/m2 (n=28)	3,9 \pm 0,3	0,5	2,2 \pm 0,6	0,5	3,3 \pm 0,3	0,48
Pacientes (n=40)						
m1/m1 (n=23)	5 \pm 0,6	-	5,3 \pm 1,4	-	5 \pm 0,7	-
m1/m2 (n=14)	5,5 \pm 0,7	0,6	4,9 \pm 1,2	0,62	5,2 \pm 0,7	0,9
m2/m2 (n=3)	7,7 \pm 1,5	0,14	9,5 \pm 4,4	0,12	8,3 \pm 1,4	0,15
m1/m2;m2/m2 (n=17)	6 \pm 0,6	0,25	6 \pm 1,3	0,24	5,9 \pm 0,7	0,42

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (em relação ao genótipo selvagem do mesmo grupo).

CYP1A1→m1/m1: homozigoto para o alelo selvagem; m1/m2: heterozigoto; m2/m2: homozigoto para o alelo mutante.

Tabela 46. Média \pm Erro Padrão da % de DNA na cauda, do Tail Moment (TM) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM sem tratamento quimio/radioterápico e mulheres controles em relação aos diferentes genótipos do gene *COMT*. Foram analisados 50 nucleóides/indivíduo.

Grupo	%DNA		TM		OTM	
	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P	Média \pm EP	P
Controles (n=77)						
Val/Val (n=25)	3,8 \pm 0,4	-	2,4 \pm 0,7	-	3,3 \pm 0,4	-
Val/Met (n=43)	4 \pm 0,2	0,48	2,6 \pm 0,6	0,65	3,3 \pm 0,3	0,5
Met/Met (n=9)	4,4 \pm 0,4	0,39	2,7 \pm 0,6	0,08	3,9 \pm 0,4	0,07
Val/Met;Met/Met (n=52)	4 \pm 0,2	0,4	2,6 \pm 0,6	0,48	3,3 \pm 0,3	0,38
Pacientes (n=40)						
Val/Val (n=13)	5,3 \pm 0,7	-	5,8 \pm 1,9	-	5,5 \pm 0,9	-
Val/Met (n=24)	5,6 \pm 0,6	0,74	5,8 \pm 1,2	0,88	5,4 \pm 0,7	0,96
Met/Met(n=3)	4,8 \pm 1,8	0,5	2,6 \pm 1,6	0,34	4,8 \pm 2,3	0,42
Val/Met;Met/Met (n=27)	5,5 \pm 0,6	0,8	5,5 \pm 1,1	0,72	5,3 \pm 0,7	0,91

P:Teste de Mann Whitney com $\alpha = 0,05$ (em relação ao genótipo selvagem do mesmo grupo).

COMT→Val/Val: homocigoto para o alelo selvagem; Val/Met: heterocigoto; Met/Met: homocigoto para o alelo mutante.

5. DISCUSSÃO

Considera-se de suma importância que nos estudos epidemiológicos citogenéticos e moleculares os indivíduos do grupo de estudo e do grupo controle sejam pareados de acordo com a idade, sexo, etnia e hábitos tabagista e etilista.

Uma vez que no presente estudo o objetivo principal foi associar alguns polimorfismos de genes envolvidos na biossíntese e metabolização de estrógenos com as lesões genômicas espontâneas detectadas em mulheres com CM, foi de fundamental importância uma caracterização detalhada e minuciosa tanto do grupo de pacientes com CM quanto do grupo controle.

Salvo que houve uma frequência maior de mulheres acima dos 45 anos de idade no grupo de pacientes do que no grupo controle, todos os outros dados referentes ao hábito tabagista, à idade da menarca ou da menopausa, ao número de gestações, ao uso de hormônios em algum momento da vida, à presença de familiares com câncer, à idade da primeira gestação e à distribuição das diferentes etnias apresentaram-se similares entre pacientes e controles incluídos para a análise molecular e citogenética, garantindo assim segurança para os dados obtidos pelos ensaios biológicos realizados.

Outro fato importante é que tanto pacientes quanto controles incluídos na pesquisa, recebiam atendimento no mesmo ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, passando assim pelos mesmos critérios de avaliação clínica. Sendo assim, só foram incluídas no grupo controle mulheres as quais seguramente não apresentavam nenhum tipo de neoplasia. Isso tornou as amostras coletadas do grupo controle dessa pesquisa bastante homogênea.

5.1 As lesões genômicas espontâneas detectadas em mulheres com CM e mulheres saudas

Um dos objetivos propostos por esse trabalho foi avaliar e comparar as lesões presentes no DNA de mulheres saudas com mulheres com CM antes de qualquer tratamento quimio e/ou radioterápico.

Para a detecção dos danos no DNA foi utilizado o Teste do MN e o Ensaio Cometa realizados em linfócitos do sangue periférico humano. A utilização de linfócitos do sangue periférico humano tem sido uma ferramenta de fundamental importância para a detecção de danos no DNA uma vez que essa população de células é de fácil acesso, abundante, homogênea, capaz de dividir-se *in vitro* quando estimulada por fitohemaglutinina e possui uma meia vida de 3-6 meses circulando pelo organismo, estando assim presentes nos eventos genotóxicos que ocorrem nos diversos tecidos do organismo (Preston *et al.*, 1987; Fenech, 2005).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que não houve diferenças significativas nos valores do IDN quando se comparou o grupo de pacientes com CM e o grupo controle, demonstrando que a presença da neoplasia não acarretou eventos citotóxicos, não exercendo assim interferência aparente sobre a cinética do ciclo ou sobre a morte celular.

Em contrapartida, observou-se que o grupo de pacientes com CM apresentou valores médios de MNs por 1000 células binucleadas e de CBMN significativamente maiores do que o grupo controle. Sabe-se que os MNs são formados pela condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou por cromossomos inteiros perdidos durante a divisão celular e que esse é o único biomarcador que permite a avaliação tanto de efeitos clastogênicos quanto de efeitos aneugênicos num grande número de células, uma vez que os MNs são detectados na intérfase (Pastor *et al.*, 2003). Os valores médios de MNs obtidos no grupo controle do presente trabalho estão de acordo com os dados da literatura para níveis basais de MNs em populações não expostas e média de idade similar (Bolognesi *et al.*, 1999; Varga *et al.*, 2006).

Os dados obtidos demonstram que o hábito tabagista não exerceu influência sobre os valores médios de MNs e de CBMN quando a comparação foi feita entre pacientes com CM fumantes e não-fumantes e controles fumantes e não-fumantes. Os resultados a respeito da influência do tabagismo sobre os níveis basais de danos no DNA ainda são controversos. Linfócitos do sangue periférico de fumantes com consumo pesado de cigarro parecem exibir freqüências significativamente maiores de MNs do que os de não-fumantes (Bonassi *et al.*, 2003). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com Hoffmann e Speit (2005) que, num trabalho extremamente cuidadoso usando o Teste do MN e o Ensaio Cometa, não observaram nenhuma diferença significativa entre fumantes e não-fumantes com relação às lesões espontâneas no DNA.

Outro fator levado em consideração na análise dos resultados obtidos pelo Teste do MN foi a idade, uma vez que o envelhecimento pode estar associado aos processos de instabilidade genética (Vijg, 2004). Além disso, observou-se que as mulheres do grupo de pacientes apresentaram uma média maior de idade em relação ao grupo controle. Essa diferença poderia interferir nos resultados da análise citogenética, pois existe um declínio relacionado à idade na eficiência dos processos de reparo do DNA, que poderia resultar em um acúmulo de mutações ocasionando um aumento no nível de danos no DNA, os quais, em nível citogenético, refletem-se no aumento das freqüências de aberrações cromossômicas (Barnett e King, 1995; Bohr, 1995; Wojda *et al.*, 2006).

Considerando-se a idade nos dados obtidos pelo Teste do MN pode-se verificar que tanto dentro do grupo de pacientes quanto do grupo controle, há um aumento discreto, mas não significativo, nas médias de MNs e de CBMN no grupo de mulheres com idade ≥ 40 anos. Quando são comparados pacientes e controles dentro da mesma faixa etária, fica evidente que o grupo de pacientes apresentou valores médios de MNs e de CBMN maiores do que o grupo controle. Com o objetivo de melhor explorar as relações com a idade, dividiram-se os grupos de pacientes e controles em três faixas etárias com intervalos de 15 anos cada. Essa análise

mostrou que o pequeno aumento nas médias de MN e de CBMN no grupo de pacientes não foi significativo e que no grupo controle não foi observado aumento em decorrência da idade.

A literatura relata a existência de associação entre o envelhecimento e a frequência de MNs em sangue periférico humano; no entanto observações como essas requerem cuidados experimentais prévios como a escolha de tempo de cultura, a opção da utilização da Cit-B e o tempo de colheita das células, pois juntos, esses fatores podem aumentar o poder de sensibilidade do teste a assim detectar variações sutis das frequências dos MNs em diferentes faixas etárias (Bolognesi *et al.*, 1999). No presente trabalho optou-se por seguir o protocolo de inibição da citocinese pela Cit-B em cultura temporária de linfócitos de 72 horas, o que assegura a confiabilidade dos valores de MNs observados.

Como no presente trabalho foram incluídas apenas pacientes com CM do tipo ductal *in situ* ou invasor foi possível fazer uma comparação detalhada dos valores médios de MNs e do IDN considerando-se as características clínico-patológicas do grupo de pacientes. Não foi constatada nenhuma influência do tamanho tumoral, dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona), da expressão da proteína P53 mutada ou da oncoproteína Cerb-B2, da presença de linfonodos acometidos por metástase ou ainda da presença de focos de metástase à distância sobre os valores médios de MNs ou do IDN. Dessa forma, pôde ser demonstrado que as características histo-patológicas dos tumores das pacientes incluídas no estudo não influenciaram as lesões citogenéticas nem tampouco a cinética do ciclo celular observados nas pacientes.

Além dos biomarcadores de citogenética clássica amplamente utilizados nos estudos de genética toxicológica, o Ensaio Cometa surgiu como uma importante ferramenta para a detecção de lesões presentes no DNA por ser uma técnica rápida, sensível e que abole a necessidade de populações celulares em proliferação (Collins, 2004; Kopjar *et al.*, 2006).

Assim como no Teste do MN, os dados obtidos pelo Ensaio Cometa mostraram que as pacientes com CM apresentaram níveis significativamente maiores de lesões no DNA. Para

esses dados também foram feitas análises levando-se em consideração o hábito tabagista e as diferentes faixas etárias de pacientes e controles. Os resultados obtidos mostraram que pacientes e controles fumantes apresentaram níveis maiores de danos no DNA em relação às não-fumantes, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Com relação à idade, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de danos no DNA pacientes e controles.

Uma modificação do Ensaio Cometa utilizando as enzimas ENDO III ou FPG, que permite a detecção de purinas ou pirimidinas oxidadas, foi aplicada a uma parte das amostras obtidas de pacientes e controles. Os resultados mostraram uma abundância maior, mas não significativa, de danos oxidativos presentes no grupo de pacientes com CM. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Blasiak *et al.* (2004), que afirmaram que os danos oxidativos e a alquilação no DNA contribuem para a prevalência de elevados níveis de danos no DNA detectados pelo Ensaio Cometa em pacientes com CM.

Ainda com relação ao Ensaio Cometa tendo em vista que, assim como no Teste do MN, os danos no DNA apresentados pelo grupo de pacientes com CM foram significativamente maiores do que no grupo controle independentemente do hábito tabagista ou da idade, decidiu-se analisar os dados obtidos de acordo com as características histo-patológicas dos tumores do grupo de pacientes. Entretanto, nenhuma dessas características exerceu qualquer tipo de influência sobre os níveis de danos no DNA detectados pelo Ensaio Cometa nas pacientes com CM.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que pacientes com câncer ainda sem tratamento quimio e/ou radioterápico apresentam níveis mais elevados de danos no DNA do que controles saudáveis. Recentemente um estudo bem elaborado e com um número amostral grande (128 controles e 158 casos) mostrou que pacientes com câncer de próstata apresentaram níveis significativamente maiores de danos no DNA do que o grupo controle (Lockett *et al.*, 2006).

Outro trabalho também sugeriu que os danos no DNA detectados pelo Ensaio Cometa podem servir como um marcador de suscetibilidade ao CM (Smith *et al.*, 2003).

Recentemente, Varga e colaboradores (2006) realizaram um estudo do tipo caso-controle e demonstraram uma diferença significativa nas médias de MNs entre pacientes com CM esporádico sem nenhum tratamento quimio/radioterápico e controles, sendo que essas diferenças eram tanto para os valores basais de MN quanto para os valores obtidos após a irradiação das culturas de linfócitos. Esse estudo ainda demonstrou que pacientes que foram tratados por quimio e/ou radioterapia há até 5 anos apresentaram valores médios de MNs maiores do que aqueles que ainda não tinham sido submetidos a nenhum tratamento mostrando assim que o tratamento, mesmo após muito tempo, pode comprometer significativamente a precisão das comparações acerca dos danos genéticos encontrados em pacientes com CM e seus respectivos controles.

Em contrapartida Lockett e colaboradores (2006) não encontraram diferenças nas lesões presentes no DNA de pacientes com câncer de próstata antes ou após 6 meses do término do tratamento. No entanto, os autores relataram os casos incidentes foram mais suscetíveis à indução de danos no DNA realizada *in vitro* com H₂O₂ do que casos prevalentes, possivelmente por estarem sujeitos à ação de fatores associados aos tumores, tais como antígenos e citocinas, o que acarretaria numa ocorrência maior de danos oxidativos.

A existência de associação entre a indução de MN e desenvolvimento de câncer baseia-se em um grande número de observações. As mais substanciais incluem: (i) uma alta frequência desses biomarcador em pacientes não tratados e em pacientes afetados por doenças congênitas que aumentam a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores, como a Síndrome de Bloom ou Ataxia Telangectasia; (ii) a presença de frequências elevadas de MN na mucosa oral, usada como um biomarcador, em ensaios de quimioprevenção clínica; (iii) a correlação existente entre agentes genotóxicos indutores de MN, como radiações ionizantes e ultravioleta e, (iv) a relação inversa entre a frequência de MN e as concentrações e/ou

ingestões diárias de certos micronutrientes associados com o risco reduzido de câncer (Bonassi et al, 2007).

Ainda não existe uma evidência direta dos mecanismos que podem influenciar o aumento das freqüências basais de danos no DNA aumentadas em pacientes com câncer, mas sugere-se que existam duas possibilidades: i) os linfócitos estimulados em cultura provenientes de pacientes com câncer podem representar uma sub-população celular mais sensível do que os linfócitos de indivíduos saudáveis; ii) pacientes e controles apresentam padrão similar de resposta aos estímulos da proliferação de linfócitos em cultura, mas os linfócitos dos pacientes possuem características diferentes com relação à sensibilidade aos danos e ao reparo do DNA (Varga *et al.*, 2006).

Os resultados do trabalho de Bonassi e colaboradores (2007) apóiam a hipótese de que a freqüência de MN em linfócitos do sangue periférico humano serve como biomarcador preditivo para o risco ao câncer e mostram a força e ampliam as evidências acumuladas por estudos experimentais, onde a extensão dos danos genéticos medidos em linfócitos refletem a ocorrência de eventos genéticos precoces em tecidos alvo.

5.2 Os polimorfismos genéticos relacionados às enzimas envolvidas nas etapas de biossíntese e metabolização de estrógenos

Na última década, acumulou-se um grande número de evidências que sugerem que as variações genéticas interindividuais, definidas pelos polimorfismos gênicos, atuam como um importante fator de risco para determinadas doenças. Sabe-se ainda que muitas doenças não possuem uma origem monogênica, mas são resultantes de uma interação complexa entre fatores ambientais e vários genes. Sendo assim, genes diferentes agindo em inúmeras combinações que podem influenciar a suscetibilidade individual a determinadas doenças (Huber *et al.*, 2002).

Podem ser definidas a existência de duas classes de genes de suscetibilidade ao câncer: (i) genes com variação alélica, que conferem um elevado risco individual para o CM (genes de alta penetrância); (ii) genes que conferem um baixo ou moderado risco ao câncer aos indivíduos que carregam suas variantes alélicas (genes de baixa penetrância) (Rebbeck, 1999).

O foco em cima do estudo dos genes de baixa penetrância fundamenta-se sobre a sua interferência em vias bioquímicas e fisiológicas que possam interferir na carcinogênese mamária, pois os genes polimórficos candidatos incluem aqueles que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de estrógenos e de carcinógenos, e ainda na detoxificação das espécies reativas de oxigênio que possam emergir dessas reações (Mitrunen e Hirvonen, 2003).

Exceto os fatores de risco ligados ao componente familiar de alterações em genes relacionados à carcinogênese mamária como mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que são de alta penetrância, a exposição prolongada aos estrógenos constitui um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do câncer de mama, seja pela idade menarca precoce ou menopausa tardia, pelos altos níveis de estrógenos na urina ou no soro, bem como pelos baixos níveis de proteínas de ligação aos hormônios que levam a uma elevada

biodisponibilidade de estrógenos livres (Hankinson *et al.*, 1998; Kristensen e Børresen-Dale, 2000).

Dessa forma, os polimorfismos que estão associados com o risco ao câncer de mama têm sido identificados em genes envolvidos numa grande variedade de funções, que incluem o metabolismo de hormônios esteróides, a detoxificação de carcinógenos ambientais, o reparo do DNA e o controle do ciclo e da morte celular (Dunning *et al.*, 1999). Uma vez que os estrógenos desempenham um importante papel na carcinogênese e na progressão do CM, tem sido dada uma atenção especial aos polimorfismos de genes envolvidos na biossíntese e metabolização desses hormônios (Kristensen e Børresen-Dale, 2000). Acredita-se que esses polimorfismos afetem a síntese e degradação dos estrógenos, influenciando conseqüentemente, no risco ao desenvolvimento ao câncer de mama (Miyoshi e Noguchi, 2003)

Com base nessas informações um dos objetivos desse trabalho foi avaliar se os genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* associam-se com o risco ao desenvolvimento do CM. Para isso, foi determinada a freqüência do polimorfismo desses genes em uma amostra de 104 pacientes com CM do tipo ductal *in situ* ou invasor e em 131 mulheres controles.

Inicialmente, investigou-se uma possível influência da etnia sobre a distribuição dos diferentes genótipos no grupo de pacientes e controles estudados neste trabalho. A população brasileira é multi-étnica, sendo constituída principalmente por descendentes ibéricos, africanos e sul-ameríndios (Amorim *et al.*, 2002). A análise do DNA mitocondrial e do cromossomo Y revelou que a maior parte da população brasileira é composta por uma mistura de portugueses e africanos e ameríndios sul-americanos (Carvalho-Silva *et al.*, 2001).

Diante de uma miscigenação tão complexa, durante a coleta dos dados do presente trabalho priorizou-se a classificação por três principais grupos étnicos da população brasileira: brancos, pardos e negros. Essa classificação foi feita visualmente sempre pelo mesmo

investigador, sem a utilização de nenhum aparelho de difração e tentando manter o mínimo de tendenciosidade possível.

Os dados obtidos mostram que, tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle, houve uma frequência maior de brancos seguidos por pardos e negros, respectivamente. Infelizmente, o tamanho amostral dos grupos reduz significativamente o poder de análise estatística para as comparações das frequências dos genótipos entre os diferentes grupos étnicos. Sendo assim, alguns genótipos não foram sequer detectados em determinados grupos, como por exemplo, o genótipo A2/A2 no grupo de negros em pacientes e controles, ou o genótipo Leu/Leu nos negros do grupo controle. Vale ainda ressaltar que, mesmo quando foi possível realizar a análise estatística não foi observada nenhuma influência da etnia sobre os genótipos aqui estudados, tanto em pacientes quanto no grupo controle.

Sendo assim, optou-se por discutir os resultados aqui obtidos sem levar em consideração a etnia do grupo de pacientes e controles aqui estudado, uma vez que seria extremamente arriscado abordar esse aspecto étnico numa amostra oriunda de uma população tão miscigenada e heterogênea como a brasileira.

O citocromo P450c17 (*CYP17*) é uma enzima chave envolvida na biossíntese de estrógeno, uma vez que possui as funções de 17 α -hidroxilase e 17,20-liase, estando envolvida tanto na conversão da pregnenolona e da progesterona aos seus respectivos 17-hidroxi metabólitos, bem como na subsequente conversão desses intermediários à dehidroepiandrosterona (DHEA) ou androstenediona, os precursores da estrona e da testosterona (Zuber *et al.*, 1986;Sharp *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos do tipo caso-controle têm relatado que, em determinados subgrupos de mulheres com CM avançado, como em mulheres jovens ou em mulheres pós-menopausa, um único polimorfismo na região 5' não traduzida do gene *CYP17* (uma substituição T para C a 34pb antes do sítio de iniciação da tradução e 27pb abaixo do sítio de início da transcrição)

pode estar associado ao risco aumentado para o desenvolvimento dessa neoplasia (Feigelson *et al.*, 1997; Bergman-Jungstrom *et al.*, 1999; Miyoshi *et al.*, 2000).

No presente trabalho não foi encontrada nenhuma associação entre a presença do alelo A2 (assim denominado quando a substituição T para C cria um sítio de corte para a enzima de restrição MspA1I) e o risco para o desenvolvimento do CM nas mulheres estudadas. Similarmente, outros estudos também não conseguiram demonstrar uma forte associação entre os diferentes genótipos do *CYP17* e o risco ao CM (Dunning *et al.*, 1998; Helzlsouer *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Kristensen *et al.*, 1999; Kuligina *et al.*, 2000).

O trabalho de Miyoshi e colaboradores (2000) mostrou que o alelo A2 não esteve associado de modo significativo com o CM quando se considerou toda a amostra estudada, mas uma análise de acordo com a idade das pacientes conseguiu demonstrar a associação entre esse alelo variante de o risco ao desenvolvimento ao CM após os 55 anos de idade, ou seja, numa média de idade pós-menopausa. Contraditoriamente, outros autores relatam que o alelo A2 confere um risco aumentado ao CM em mulheres pré-menopausa quando comparadas às mulheres pós-menopausa (Malin *et al.*, 1999; Chakraborty *et al.*, 2007). Já foi demonstrado que o CM em mulheres mais jovens, quando comparadas às mulheres mais velhas, é diferente em termos de aspectos patológicos e de prognóstico, sugerindo assim que o desenvolvimento dessa neoplasia em mulheres mais jovens possa ter origens biológicas diferentes (Chakraborty *et al.*, 2007). No presente trabalho esse tipo de análise não foi realizada devido ao tamanho amostral pequeno aliado a um número ainda menor de pacientes com idade acima dos 55 anos.

Um fato interessante é que, apesar do alelo A2 não afetar a suscetibilidade de risco ao CM, mulheres com genótipo homocigoto desse alelo podem apresentar níveis significativamente elevados de estrona e DHEA e uma modesta elevação nos níveis de estradiol, testosterona e androstenediona (Haiman *et al.*, 1999). Sabe-se que a substituição T→C cria um sítio Sp-1 que regula a atividade transcricional do gene conferindo assim uma

maior biodisponibilidade do estradiol (Feigelson *et al.*, 1997; Kristensen *et al.*, 1999). Também tem sido sugerido que esse polimorfismo pode conferir um grau de suscetibilidade maior ao desenvolvimento da Síndrome do Ovário Policístico (SOP) por contribuir para a desregulação da expressão do gene *CYP17*, o que resultaria numa super atividade da enzima P450c17 α nos ovários, contribuindo assim para uma hiperandrogenemia, característica peculiar da SOP (Carey *et al.*, 1994; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 1999). Se o polimorfismo T \rightarrow C no gene *CYP17* é fator de suscetibilidade ao CM por alterar os níveis de estradiol biodisponível e a expressão da enzima por ele codificada é fato ainda sujeito a investigação.

Esse trabalho também investigou o polimorfismo *Val432Leu*, localizado no éxon 3 do gene *CYP1B1*, o qual é um forte candidato para a suscetibilidade ao CM.

O *CYP1B1* é uma enzima de fase I que catalisa a conversão do 17 β -estradiol à 4-hidroxiestradiol, um subproduto cujo potencial carcinogênico tem sido demonstrado em modelos animais (Hayes *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 2002). Além disso, tem sido demonstrado que esse gene está envolvido na ativação metabólica de alguns carcinógenos ambientais, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs) e aril aminas (Shimada *et al.*, 1999).

Uma vez envolvido no metabolismo do estradiol, os polimorfismos no *CYP1B1* são fortes candidatos de associação de risco ao desenvolvimento de patologias hormônio-dependentes. Porém, recentemente, um estudo realizado com 221 pacientes coreanas apresentando um quadro de endometriose avançada mostrou que os polimorfismos presentes nas regiões codificantes do *CYP1B1* não conferem risco algum de suscetibilidade a essa doença (Cho *et al.*, 2007). Mas, doenças como o câncer de próstata e de ovário têm sido associadas positivamente com o polimorfismo *Val432Leu* no *CYP1B1* (Tang *et al.*, 2000; Goodman *et al.*, 2001).

O *CYP1B1* tem sido considerado um gene de grande importância na suscetibilidade ao CM, sendo que inúmeros estudos têm abordado o papel dos seus polimorfismos no desenvolvimento dessa doença. Zheng e colaboradores (2000) fizeram a análise do

polimorfismo *Val432Leu* numa população de 200 mulheres com CM em Shangai comparando com 200 mulheres controles pareadas de acordo com a idade. Eles demonstraram que o genótipo *Leu/Leu* estava associado com o risco elevado de CM, sendo que esse risco chegava a ser até quase três vezes maior em mulheres com CM após a menopausa.

Os dados encontrados no presente trabalho mostraram que no grupo controle o genótipo *Val/Leu* conferiu um risco menor para o CM (OR: 0,5; IC: 0,2-0,9), mas o genótipo homozigoto *Leu/Leu* mostrou uma tendência de associação com a suscetibilidade ao CM no grupo de pacientes (OR: 1,8; IC: 0,8-3,9). Muito provavelmente o tamanho da amostra de pacientes não foi suficientemente grande para comprovar estatisticamente essa associação.

Quanto aos dados obtidos no grupo controle, as freqüências genóticas obtidas (*Val/Val*: 22,9%; *Val/Leu*: 63,3% e *Leu/Leu*: 13,8%) estão de acordo com o trabalho de Zheng *et al.* (2000) que obteve no grupo controle de seu estudo 22% *Val/Val*, 64% *Val/Leu* e 15% *Leu/Leu*. É interessante observar que, mesmo a freqüência de heterozigotos *Val/Leu* tendo sido significativamente diferentes, entre controles e pacientes as freqüências alélicas são semelhantes. Dessa forma, apesar de haver uma tendência do genótipo homozigoto conferir maior risco de suscetibilidade ao CM uma vez que apresentou uma freqüência quase três vezes maior no grupo de pacientes do que no grupo controle, os resultados aqui apresentados não permitem uma afirmação tão incisiva com relação a isso.

Assim como o presente estudo outros trabalhos também não conseguiram demonstrar a associação entre o polimorfismo *Val432Leu* e o CM (Wen *et al.*, 2005; Sillanpää *et al.*, 2007).

Quanto ao gene *CYP1A1*, entre os polimorfismos descritos, dois levam à troca de aminoácido no éxon 7: *Thr461Asn* e *Ile462Val* (Hayashi *et al.*, 1991; Cascorbi *et al.*, 1996), uma transição T→C (T3801C) na posição 3' não-codificante (Chen *et al.*, 2007) e ainda a transição T→C (T6235C) também na região 3' não-codificante do gene (Miyoshi e Noguchi, 2003).

O citocromo P450 1A1 é uma das principais enzimas de Fase I expressa no tecido mamário. Essa enzima está envolvida tanto no metabolismo de estrógenos, mediando a hidroxilação do 17- β estradiol principalmente à 2-hidroxiestradiol e carcinógenos mamário como no metabolismo de carcinógenos tais como os PHAs e as aminas heterocíclicas (Spink *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2007).

O polimorfismo estudado no presente trabalho foi a transição T3205C na região 3' não-codificante do gene (Crofts *et al.*, 1993) que pode afetar a modulação da atividade da enzima, servindo como um marcador para o metabolismo alterado dos estrógenos, o que poderia aumentar o risco à suscetibilidade ao CM (Taioli *et al.*, 1999).

Os resultados aqui obtidos não mostraram nenhuma diferença significativa na distribuição dos genótipos referentes a esse polimorfismo entre pacientes e controles, indicando que esse polimorfismo não está associado com a suscetibilidade ao CM na amostra populacional estudada. Resultados muito similares com relação à distribuição dos diferentes genótipos desse polimorfismo foram encontrados por Amorim e colaboradores (2002) que também não encontraram relação entre o polimorfismo T6235C e o risco ao CM após estudarem 128 pacientes e 256 controles.

Interessantemente alguns trabalhos têm relatado uma forte associação entre esse polimorfismo e o CM. Estudando 51 casos e 269 controles Taioli e colaboradores (1995) mostraram um risco ao CM aumentado de aproximadamente nove vezes nos afro-americanos portadores do genótipo m2/m2. De modo semelhante, numa amostra populacional taiwanesa de 150 pacientes com CM e 150 controles foi encontrada uma associação positiva entre o CM e a presença do alelo m2 (Huang *et al.*, 1999).

Nesse trabalho também foi analisado um polimorfismo no gene *COMT*. A enzima catecol-O-metil-transferase existe em duas formas distintas: como uma proteína citoplasmática ou em associação com membranas; ambas as formas possuem a seqüência de aminoácidos

idêntica, exceto por uma extensão de 50 aminoácidos na região NH₂-terminal da forma ligada à membrana (essa seqüência de aminoácidos serve como base de ancoragem da proteína à membrana) (Bertocci *et al.*, 1991; Ulmanen e Lundstrom, 1991).

A transição G→A no códon 158 do gene *COMT* leva à substituição de uma valina por uma metionina o que pode ser responsável por um decréscimo de até três vezes na atividade enzimática e aumento na termolabilidade (Lotta *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 1996). Sendo assim, a inativação de catecol-estrógenos torna-se prejudicada, podendo aumentar o potencial carcinogênico desses compostos (Matsui *et al.*, 2000).

Além de estar sendo extensivamente estudado como um gene cujos polimorfismos podem estar associados às doenças de ordem neuro-psicológicas, alguns estudos epidemiológicos indicam que o polimorfismo do *COMT* para uma baixa atividade enzimática (*Val158Met*) pode estar associado com um risco aumentado para o desenvolvimento do CM (Lavigne *et al.*, 1997; Yim *et al.*, 2001; Kocabas *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, não foi encontrada nenhuma associação entre a presença do alelo Met e a suscetibilidade ao CM uma vez que as distribuições genótípicas em pacientes e controle são extremamente similares. A distribuição dos genótipos obtida em pacientes e controles no nosso estudo é muito semelhante à encontrada por Kocabas e colaboradores (2002) numa população turca, que também não observaram influência do *COMT* sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento de CM.

Semelhantemente, em um estudo realizado com 88 pacientes e 344 controles de uma população de mulheres de Taiwan não foi encontrada associação entre o polimorfismo *Val158Met* e o CM (OR= 1,13; IC: 0,39-3,26) (Lin *et al.*, 2005). Esse trabalho contrariou um estudo realizado previamente também com um grupo de mulheres taiwanesas (150 pacientes e 150 controles) onde o *COMT* mostrou ser o gene de maior suscetibilidade de risco ao CM (OR= 3,55; IC: 1,15-13,37) (Huang *et al.*, 1999).

O polimorfismo que afeta a atividade enzimática do *COMT* pode causar uma modesta elevação no risco ao CM nos portadores do alelo Met, mas isso é apenas uma tendência e não um dado com significado estatístico consistente (Modugno *et al.*, 2005).

O CM é uma doença muito complexa cuja etiologia envolve fatores genéticos, hormonais e ambientais. Sendo assim esse trabalho também avaliou se o tabagismo e o tempo de exposição aos estrógenos durante a vida modificariam a suscetibilidade ao CM de acordo com os polimorfismos aqui estudados.

Por ser um gene envolvido diretamente nas etapas de biossíntese dos estrógenos e não estar relacionado à conversão de subprodutos do metabolismo do cigarro, não existem relatos freqüentes na literatura da influência do *CYP17* sobre a suscetibilidade ao CM em mulheres fumantes e não-fumantes. Os dados aqui apresentados evidenciam que nenhum dos genótipos do *CYP17* modificou a suscetibilidade ao CM, quando o tabagismo foi levado em consideração.

Em contrapartida, os resultados referentes ao polimorfismo *Val432Leu* do *CYP1B1* são bastante interessantes. A tendência observada de aumento de risco ao CM em mulheres observada na análise global dos dados é confirmada estatisticamente quando se levam em consideração apenas mulheres não-fumantes. É possível observar que, no grupo de não-fumantes, existe uma freqüência significativamente maior de mulheres cujo genótipo é Leu/Leu no grupo de pacientes em relação ao controle (OR= 3; IC: 1,1-8,2). Essa associação não é verificada no grupo de fumantes, onde se observa uma associação do genótipo Val/Leu (56,3%) com o grupo controles, indicando um possível efeito protetor do alelo (OR= 0,1; IC: 0,02-0,5). Entretanto, o grupo de fumantes é representado por um número significativamente reduzido de mulheres (em torno de 25% do número total) fazendo com que esses dados sejam examinado com cautela. Como pode ser observado, a “Odds Ratio” foi de 0,1, porém o intervalo de confiança é muito extenso (0,02-0,5).

Num estudo realizado com 483 pacientes com CM e 482 controles na Finlândia a cerca do mesmo polimorfismo no *CYP1B1*, Sillanpää e colaboradores (2007) mostraram que o hábito tabagista pode modificar o risco ao CM. Esses pesquisadores estratificaram pacientes e controles em vários níveis de exposição ao cigarro, abrangendo não-fumantes e fumantes passivos até fumantes por mais ou menos de 15 anos. Eles encontraram uma tendência de risco maior ao CM entre fumantes portadores do alelo Leu.

Portanto, apesar dos resultados aqui obtidos não terem mostrado influência do polimorfismo estudado no *CYP1B1* e risco ao CM entre fumantes, não é possível destacar um papel desse polimorfismo para o risco a doença, uma vez que o citocromo P450 1B1 possui uma atividade catalítica importante sobre inúmeras PHAs, incluindo o benzo(a)pireno (Shimada *et al.*, 1996).

Com relação ao polimorfismo estudado no gene *CYP1A1* também não mostram modificação do risco ao CM em função do genótipo em não-fumantes e fumantes.

No entanto alguns trabalhos relatam que diferentes polimorfismos presentes no *CYP1A1* podem mudar o risco ao CM em fumantes e não-fumantes (Ishibe *et al.*, 1998; Moysich *et al.*, 1999), pois a enzima P450 1A1 metaboliza não apenas estrógenos, mas também carcinógenos ambientais (Law, 1990). Assim, na medida em que polimorfismos no *CYP1A1* modificam o risco ao CM apenas em fumantes, pode-se sugerir que o alelo variante afeta o risco ao CM muito mais por modificar o metabolismo de carcinógenos ambientais do que o metabolismo de estrógenos (Miyoshi e Noguchi, 2003). Porém, o *CYP1A1* pode detoxificar ou causar toxicidade dependendo de alguns fatores como o conteúdo sub-celular e a localização, o quanto ocorre de metabolismo na Fase II, o contexto célula e tecido específico, bem como a farmacocinética; assim, na via metabólica das PHAs, o *CYP1A1* tende a aumentar o risco ao CM por ativação carcinogênica, enquanto que na via metabólica estrogênica, esse gene pode até mesmo reduzir esse risco (Chen *et al.*, 2007).

Com relação ao polimorfismo estudado no gene *COMT*, os dados aqui apresentados demonstram que não há associação entre os genótipos detectados nesse gene e risco diferenciado para o CM entre não-fumantes e fumantes.

Assim como o *CYP17*, pouco se discute na literatura a respeito da influência do *COMT* sobre o risco de CM diferenciado entre não-fumantes e fumantes. No entanto, assim como o presente trabalho, Modugno e colaboradores (2005) também não encontraram associação do polimorfismo com o risco ao CM entre mulheres brancas tabagistas. Segundo o trabalho de Saintot e colaboradores (2003) a via estrogênica da catecol-O-metiltransferase parece não modificar o metabolismo dos compostos do tabaco.

Existe uma ampla abordagem na literatura a respeito do tempo de exposição aos estrógenos e o risco ao desenvolvimento ao CM. Alguns trabalhos relatam que alguns polimorfismos em genes de biossíntese e metabolização de estrógenos podem modificar o tempo de exposição a esses hormônios, servindo como um fator de risco importante na etiologia dessa neoplasia.

Nesse trabalho também foi feita uma análise comparativa entre os polimorfismos avaliados e a idade da menarca e da menopausa, o que poderia modificar a suscetibilidade ao CM.

Os resultados obtidos aqui não mostraram influência do polimorfismo no gene *CYP17* sobre a idade da menarca ou da menopausa tanto em pacientes como em controles. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que também não observaram influência do alelo A2 sobre a idade da menarca ou da menopausa (Onland-Moret *et al.*, 2005; Henningson *et al.*, 2007).

Henningson e colaboradores (2007) avaliaram a influência do alelo A2 sobre o ciclo menstrual de mulheres jovens e confirmaram que mulheres com o genótipo homocigoto A2/A2 podem ter um ciclo menstrual significativamente menor (< 27 dias). Baseando-se em alguns

outros trabalhos esses autores afirmaram que como o tamanho da fase luteal permanece relativamente constante, enquanto que o tamanho da fase folicular varia consideravelmente, as mulheres com ciclos menstruais menores permanecem proporcionalmente mais tempo na fase luteal (quando tanto os níveis de estrógeno quanto de progesterona estão elevados) do que na fase folicular (quando os níveis de progesterona são baixos e os níveis de estrógeno estão em elevação). Eles concluem, então, que a associação entre o alelo A2 e um ciclo menstrual curto sugere que o polimorfismo no gene *CYP17* pode influenciar o risco ao CM em idade mais precoce.

Com relação ao *CYP1B1* observou-se uma frequência significativamente maior de mulheres Val/Leu com menarca ≤ 13 anos no grupo de controles do que no grupo de pacientes, entretanto, quando se analisa isoladamente o grupo controle, não se observa nenhuma influência desse genótipo sobre a idade da menarca. Esse mesmo polimorfismo também não esteve associado significativamente com a idade da menopausa em controles e em pacientes. Hefler e colaboradores (2005) mostraram associação entre o polimorfismo *Asn453Ser* do *CYP1B1* e um estado de menopausa precoce, mas nenhuma associação entre a idade da menopausa ou da menarca com o polimorfismo *Val432Leu*. Do mesmo modo, mais recentemente, um estudo realizado com 1958 mulheres chinesas não mostrou nenhuma associação entre o polimorfismo *Val432Leu*, bem como de outros polimorfismos apresentados pelo *CYP1B1*, e a idade da menarca ou da menopausa (Long *et al.*, 2006).

Com relação aos polimorfismos nos genes *CYP1A1* e *COMT*, nenhum deles apresentou associação com a idade da menarca e da menopausa quando comparados pacientes com CM e controles. Pouquíssimos trabalhos enfocam a influência dos polimorfismos no *CYP1A1* sobre a idade da menarca e da menopausa, mas um trabalho realizado com 4284 mulheres brancas mostrou que o polimorfismo *Ile462Val* não apresenta nenhuma associação com essas características reprodutivas (Modugno *et al.*, 2005). Quanto ao gene *COMT*, a literatura sugere

que, quanto mais precoce for a menarca e mais tardia a primeira gestação a termo, maior o risco ao CM em mulheres portadoras do alelo Met (Lin *et al.*, 2005).

Com relação à associação dos polimorfismos estudados neste trabalho com os marcadores tumorais, apenas o genótipo Leu/Leu do gene *CYP1B1* mostrou estar relacionado com a presença de receptores de estrógeno e de progesterona. Esse é um dado interessante, porém, diferente dos dados obtidos por Justenhoven e colaboradores (2007) que encontraram uma frequência maior indivíduos negativos para os receptores de estrógeno em pacientes com o polimorfismo *Asn453Ser* do *CYP1B1*, o qual também potencializa a atividade enzimática da P450 1B1; sendo assim, esses autores propuseram que o aumento da atividade da enzima provoca uma diminuição dos níveis de estradiol e assim modula negativamente a expressão desses receptores hormonais.

Sendo assim, o significado biológico desse polimorfismo sobre a expressão dos receptores de estrógeno precisa ser melhor investigado uma vez que já foi demonstrado que os receptores de estrógeno α (ER α) se ligam aos elementos de resposta ao estrógeno e ativam a transcrição de genes alvo desse hormônio, entre eles o *CYP1B1* (Han *et al.*, 2005).

5.3 Relação entre os polimorfismos genéticos relacionados às enzimas envolvidas nas etapas de biossíntese e metabolização de estrógenos e as lesões genômicas detectadas em mulheres com CM

Nos últimos anos, um grande número de trabalhos tem sugerindo que os polimorfismos genéticos são capazes de afetar o risco para o desenvolvimento de neoplasias.

Como a carcinogênese é influenciada por múltiplos genes, espera-se que qualquer polimorfismo único contribua com apenas uma pequena parcela para o risco ao desenvolvimento de câncer (Norppa, 2003).

Dessa forma podemos definir que os genes de baixa penetrância, também chamados de genes modificadores, são aqueles cujos polimorfismos estão associados a um pequeno ou moderado risco ao CM. Esses genes podem exercer seus efeitos em vias metabólicas ou de reparo do DNA e assim contribuir para a instalação de um processo de instabilidade genômica cujo efeito pode ser o desenvolvimento da carcinogênese.

Entre esses genes estão os envolvidos nas vias de biossíntese e metabolização de estrógenos, cujos polimorfismos podem não conferir um efeito direto no risco ao CM, mas podem afetar os níveis de lesões genômicas espontâneas e assim, indiretamente, ser mais um fator adjuvante na etiologia dessa doença.

Uma vez obtidos os resultados referentes às lesões genômicas basais e aos polimorfismos aqui estudados, foi avaliado se os diferentes genótipos obtidos nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* interferiam nas freqüências de MNs ou nas lesões genômicas detectadas pelo Ensaio Cometa.

Há muitos anos as alterações citogenéticas, tais como as aberrações cromossômicas, as trocas entre cromátides irmãs e os MNs são utilizados como importantes biomarcadores de exposição genotóxica bem como dos efeitos genotóxicos de carcinógenos (Albertini *et al.*, 2003; Norppa, 2004).

Apesar das concentrações fisiológicas de estrógenos serem essenciais para o crescimento de órgãos dependentes de hormônios, para a sinalização celular e para muitas outras atividades bioquímicas e moleculares (Roy *et al.*, 2007), muitas evidências provenientes de estudos epidemiológicos e experimentais apontam para um indesejado efeito carcinogênico desses hormônios (Liehr, 2000).

A exposição da linhagem celular MCF-7 de CM ao estradiol resultou na formação de quebras de fita simples do DNA, sítios álcali-lábeis e purinas oxidadas (Rajapakse *et al.*, 2005). Porém, o estradiol sofre um processo de metabolização catalisada pelo citocromo P450 a vários catecol-estrógenos, entre eles o 2-hidroxiestradiol que é produto da ação enzimática da P450 1A1 principalmente no fígado e o 4-hidroxiestradiol, produto da ação da P450 1B1 cuja ação ocorre principalmente em órgãos extra-hepáticos suscetíveis à ação estrogênica (Suchar *et al.*, 1995; Bolton *et al.*, 1998; Zhu and Coney, 2000). Tanto o 2 quanto o 4-hidroxiestradiol são catecol-estrógenos, produtos com potencial carcinogênico muito mais pronunciado do que o estradiol (Newbold e Liehr, 2000). Sendo assim, os catecol-estrógenos podem representar potentes agentes carcinogênicos e assim participar da iniciação tumoral por causar danos ao DNA (Hiraku *et al.*, 2001). Porém, a catecol-O-metiltransferase (*COMT*) detoxifica esses catecol-estrógenos por um mecanismo de metilação (Bianco *et al.*, 2003).

Neste trabalho, o polimorfismo no gene *CYP17* não mostrou associação com os níveis de danos no DNA detectados em linfócitos do sangue periférico de pacientes com CM ou em mulheres saudáveis. Vale lembrar que o *CYP17* modula a biodisponibilidade de estradiol que possui uma ação mitogênica diretamente relacionada à regulação gênica envolvida no controle do ciclo celular e, portanto na proliferação celular podendo dessa forma associar-se com o risco ao CM (Liehr, 2000).

Também foi investigada a possibilidade do polimorfismo *Val432Leu* do gene *CYP1B1* influenciar os níveis de danos no DNA de pacientes com CM e controles. Enquanto no grupo de pacientes não foi observado nenhum efeito desse polimorfismo sobre as lesões genômicas

estudadas, foi observado que no grupo controle o alelo Leu provocou um aumento significativo nos valores médios de MNs e no TM (tail moment). Essa diferença aparente de associação do polimorfismo observada apenas no grupo controle pode ser devido ao fato de existir algum outro fator endógeno que mascare a influência do alelo Leu sobre as lesões no DNA detectadas no grupo de mulheres com CM, como por exemplo, algum processo inflamatório provocado pela própria neoplasia.

Sabe-se que o *CYP1B1* catalisa a hidroxilação do carbono 4 (C4) do estradiol formando o 4-hidroxiestradiol (4-OHE₂) que possui uma atividade carcinogênica conhecida e descrita em modelos animais (Miyoshi e Noguchi, 2003). Além disso, o 4-OHE₂ é muito similar a 16 α -hidroxiestrone que possui atividade genotóxica reagindo com o DNA para formar aductos (Zhu e Conney, 1998). Conforme dito anteriormente, o polimorfismo *Val432Leu* aumenta em até três vezes o potencial de metabolização da P450 1B1 e, por conseqüência, os níveis de 4-OHE₂ são aumentados na mesma proporção.

Em um modelo experimental *in vitro*, o 4-OHE₂ foi capaz de induzir a formação de quebras de fita simples do DNA, de sítios álcali-lábeis e a oxidação de pirimidinas, mostrando assim que esse metabólito estrogênico exerce seus efeitos genotóxicos por meio da oxidação de bases, e não pela formação de grandes aductos como se acreditava anteriormente (Rajapakse *et al.*, 2005).

Também foi feita uma análise que levou em consideração o hábito tabagista o qual, de acordo com os resultados mostrados apresentou associação com o alelo Leu. Porém, devido ao número de indivíduos aqui considerados, os efeitos do tabagismo mediante as variantes polimórficas do *CYP1B1* precisam ser mais bem investigados.

Apesar do 2-hidroxiestradiol (2-OHE₂), produto da ação da P450 1A1 sobre o estradiol, também causar danos à molécula de DNA como quebras de fita simples e 8-hidroxi guanina (Miura *et al.*, 2000) não foi observada influência do alelo m2 do gene *CYP1A1* sobre os níveis de danos no DNA observados tanto em pacientes com CM quanto em controles. Cabe aqui

ressaltar que a frequência desse alelo na população aqui estudada foi baixa, o que limita a inferência sobre a associação entre esse polimorfismo e os níveis de danos no DNA.

Por fim, também foi avaliada a influência do polimorfismo estudado no gene *COMT* sobre as lesões no DNA detectadas nas mulheres desse estudo. Como dito anteriormente, a catecol-O-metil-transferase tem uma função primordial na detoxificação dos catecol-estrógenos 4-OHE₂ e 2-OHE₂.

É interessante notar que enquanto o grupo de pacientes as mulheres cujo genótipo foi Met/Met apresentaram valores médios de MNs significativamente maiores do que as heterozigotas ou as homozigotas selvagem. No grupo controle, ao contrário, o grupo de mulheres com o alelo Met exibiu níveis menores de danos no DNA. Esses dados sugerem que o polimorfismo Met influencia diferentemente a modulação dos danos no DNA em pacientes com CM e controles sadias. Provavelmente a interação com outros genótipos, também de genes de baixa penetrância, mas com efeito protetor, tenha conferido essa aparente taxa de danos diminuída nos controles que apresentaram o alelo Met.

A catecol-O-metil-transferase também possui uma ação tecido-específica muito mais pronunciada do que, por exemplo, a P450 1A1 e 1B1 e, ao catalisar a metilação dos catecol-estrógenos, leva à diminuição dos intermediários metabólicos do estradiol que possuem notável efeito genotóxico (Dawling *et al.*, 2001). Essa ação enzimática então parece ser de fundamental importância para a manutenção da estabilidade genômica no tecido mamário.

Tendo em vista a complexidade, a incidência elevada e as implicações psico-sociais envolvidas no tratamento do CM, é necessário que sejam determinadas estratégias de investigação científica que consigam identificar com segurança os grupos de mulheres que são mais suscetíveis ao desenvolvimento dessa neoplasia. Por outro lado, sabe-se que determinados polimorfismos genéticos de metabolismo endógeno podem contribuir significativamente para a instalação de um processo de instabilidade genômica. Assim, é de fundamental importância identificar quais são esses polimorfismos e avaliar o seu efeito direto

sobre o DNA, o que pode ser um passo importante na detecção da suscetibilidade à doença. Espera-se que, futuramente, seja possível determinar estratégias de prevenção contra os danos no DNA nessas mulheres suscetíveis, como, por exemplo, pela modulação da dieta.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho propôs-se investigar se havia diferença entre os níveis de danos no DNA de mulheres com CM e mulheres sadias (controles), se os polimorfismos de alguns genes, cujas enzimas por eles codificadas envolvidas na biossíntese e metabolização de estrógenos, aumentavam a suscetibilidade ao CM e ainda se esses polimorfismos influenciavam os níveis basais danos de DNA nesta mesma amostra populacional. Os resultados aqui apresentados e discutidos permitem as seguintes conclusões:

1. O grupo de mulheres com CM ainda sem tratamento quimio e/ou radioterápico apresentou níveis maiores de danos no DNA detectados pelo teste do MN e pelo ensaio Cometa do que o grupo controle, independentemente do hábito tabagista ou da idade.
2. Os danos no DNA detectados pelo teste do MN e pelo ensaio Cometa observados nas mulheres com CM não estão associados pelo estadió clínico ou tumoral da doença.
3. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à distribuição dos diferentes genótipos estudados entre brancos, pardos e negros.
4. Os polimorfismos estudados nos genes *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP1A1* e *COMT* não influenciaram de modo diferente a idade da menarca ou da menopausa em pacientes com CM e controles.
5. Não foi encontrada nenhuma associação entre o polimorfismo estudado no gene *CYP17* e o risco ao CM.
6. Considerando o grupo de mulheres não-fumantes, o genótipo Leu/Leu do gene *CYP1B1* conferiu um risco três vezes maior ao CM.
7. Não foi encontrada associação significativa entre o CM e o polimorfismo estudado no gene *CYP1A1*.
8. O polimorfismo estudado no gene *COMT* não influenciou o risco ao CM.

9. Os polimorfismos estudados nos genes *CYP17* e *CYP1A1* não influenciaram os níveis basais de danos no DNA no grupo de pacientes com CM e no grupo controle detectados pelo teste do MN e pelo Ensaio Cometa.
10. No grupo controle, as portadoras do alelo *Leu* do gene *CYP1B1* apresentaram níveis maiores de danos no DNA quando comparadas às homozigotas para o alelo selvagem *Val*, porém, o mesmo não foi observado no grupo de pacientes com CM, onde esse polimorfismo não influenciou os níveis de danos basais detectados no DNA.
11. Mulheres do grupo controle com genótipo *Val/Met* ou *Met/Met* *COMT* apresentaram níveis reduzidos de danos no DNA quando comparadas às homozigotas selvagem. Porém, no grupo de pacientes com CM o grupo de mulheres homozigotas *Met/Met* apresentou níveis mais elevados de danos no DNA do que mulheres homozigotas selvagem ou heterozigotas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRESTI A (1992). A survey of exact inference for contingency tables. *Stat Sci* 7:131-53.

AHMAD ME, SHADAB GGHA, HODA A, AFZAL M (2000). Genotoxic effect of estradiol-17 β on human lymphocyte chromosomes. *Mutat Res* 466: 109-115.

ALBERTINI RJ, ANDERSON D, DOUGLAS GR, HAGMAR L, HEMMINKI K, MERLO F, NATARJAN AT, NORPPA H, SHUKER DE, TICE R, WATERS MD, AITIO A (2000). IPCS guidelines for the monitoring on genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463: 111-173.

AMORIM LMF, ROSSINI A, MENDONÇA GAS, LOTSCH PF, SIMÃO TA, GALLO CVM, PINTO LFR (2002). *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett* 181: 179-186.

AU WW, RIBEIRO LR (2003). Estratégias para a condução de estudos em monitoramento genotóxico de populações humanas. *In: Mutagênese Ambiental*, Ribeiro LR, Salvadori DMF e Marques EK (eds), Editora ULBRA, págs: 335-347.

BARNETT YA, KING CM (1995). An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 338: 115-128.

BERGMAN-JUNGESTROM M, GENTILE M, LUNDIN AC, WINGREN S (1999). Association between CYP17 gene polymorphism and risk of breast cancer in young women. *Int J Cancer* 84: 350-353.

BERTOCCI B, MIGGIANO V, DA PRADA M, DEMBIC Z, LAHM HW, MALHERBE P (1991). Human catecho-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *PNAS* 88: 1416-1420.

BIANCO NR, PERRY G, SMITH MA, TEMPLETON DJ, MONTANO AM (2003). Functional Implications of Antiestrogen Induction of Quinone Reductase: Inhibition of Estrogen-Induced Deoxyribonucleic Acid Damage. *Mol Endocrinol* 17: 1344-1355.

BLASIAK J, ARABSKI M, KRUPA R, WOZNIAK K, RYKALA J, KOLACINSKA A, MORAWIEC Z, DRZEWOSKI J, ZADROZNY (2004). Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res* 554: 139-148.

BOLOGNESI C, LANDO C, FORNI A, LANDINI E, SCARPATO R, MIGLIORE L, BONASSI S (1999). Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and Ageing* 28: 393-397.

BONASSI S, HAGMAR L, STRÖMBERG U, HUICI MONTAGUD A, TINNERBERG H, FORNI A, HEIKKILÄ P, WANDERS S, WILHARDT P, HANSTEEN IL, KNUDSEN L, NORPPA H (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res* 60: 1619–1625.

BONASSI S, NERI N, LANDO C, CEPPI M, LIN YP, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, FENECH M (2003). Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res* 543: 155-166.

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIE G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI MR, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28: 625-631.

BOHR VA (1995). DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis* 16: 288-2892.

BOITEUX S., GAJEWSKI E, LAVAL J, DIZDAROGLU M (1992). Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosilase): excision of purine lesions I DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochem* 31: 106-110.

BOLOGNESI C, LANDO C, FORNI A, LANDINI E, SCARPATO R, MIGLIORE L, BONASSI S (1999). Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing* 28: 393-397.

CAREY AH, WATERWORTH D, PATEL D, WHITE D, LITTLE D, NOVELLI P, FRANKS S, WILLIAMSON R (1994). Polycystic ovaries and premature pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet* 3: 1873-1876.

CARSTENSEN U, ALEXANDRIE AK, HOGSTEDT B, RANNUG A, BRATT I, HAGMAR L (1993). B- and T-lymphocyte micronuclei in chimney sweeps with respect to genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 (class Mu). *Mutat Res* 289: 187-195.

CARVALHO-SILVA D, SANTOS FR, ROCHA J, PENA SD (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 68: 281-286.

CASCORBI I, BROCKMOLLER J, ROOTS I (1996). A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 56: 4965-4969.

CHAKRABORTY A, MURTHY NS, CHINTAMANI C, BHATNAGAR D, MOHIL RS, SHARMA PC, SAXENA S (2007). CYP17 gene polymorphism and its association with high-risk north Indian breast cancer patients. *J Hum Genet* 52: 159-165.

CHEN C, HUANG Y, LI Y, MAO Y, XIE Y (2007). Cytochrome P450 1A1 (*CYP1A1*) T3801C and A2455G polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis. *J Hum Genet* 52: 423-435.

CHO YJ, HUR SE, LEE JY, SONG IO, MOON HS, KOONG MK, CHUNG HW (2007). Single nucleotide polymorphism and haplotypes of the genes encoding the CYP1B1 in Korean women: no association with advanced endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 24: 271-277.

COLLINS AR, DUTHIE SJ, DOBSON VL (1993). Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14: 1733-1735.

COLLINS AR (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261.

CROFTS F, COSMA GN, CURRIE D, TAIOLI E, TONIOLO P, GARTE SJ (1993). A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis* 14: 1729-1731.

DAWLING S, ROODI N, MERNAUGH RL, WANG XY, PARL FF (2001). Catechol-O-methyltransferase (COMT): mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res* 61: 6716-6722.

DIAMANTI-KANDARAKIS E, BARTZIS MI, ZAPANTI ED, SPINA GG, FILANDRA FA, TSIANATELI TC, BERGIELE AT, KOULI CR (1999). Polymorphism T→C (-34 bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome. *Fert Steril* 71: 431-435.

DUNNING AM, HEALEY CS, PHAROAH PD, FOSTER NA, LIPSCOMBE JM, REDMAN KL, EASTON DF, DAY NE, PONDER BA, (1998). No association between a polymorphism in the steroid metabolism gene CYP17 and risk of breast cancer. *Br J Cancer* 77: 2045-2047.

DUNNING AM, HEALEY CS, PHAROAH PD, TEARE MD, PONDER BA, EASTON DF (1999). A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 843-854.

EASTON D, FORD D, PETO J (1993). Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv* 18: 95-113.

FEIGELSON HS, COETZEE GA, KOLONEL LN, ROSS RK, HENDERSON BE (1997). A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. *Cancer Res* 57: 1063-1065.

FENECH, M, MORLEY A (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147: 29-36.

FENECH, M. (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicol.* 181-182: 411-416.

FENECH, M. (2005). In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* 111: 3-32.

FOLKERD EJ, MARTIN LA, KENDALL A, DOWSETT M (2006). The relationship between factors affecting endogenous oestradiol levels in postmenopausal women and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102: 250-255.

GOODMAN MT, Mc DUFFIE K, KOLONEL LN, TERADA K, DONLON TA, WILKENS LR, GUO C, Le MARCHAND L (2001). Case-control study of ovarian cancer and polymorphism in genes involved in catecholestrogen formation and metabolism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 209-216.

HAGMAR L, BONASSI S, STRÖMBERG U, BRØGGER A, KNUDSEN L, NORPPA H, REUTERWALL C, FORNI A, HANSTEEN IL, HÖGSTEDT B, HUICI MONTAGUD A, LAMBERT B, MITELMAN F, NORDENSON I, SALOMAA S, SKERFVING SL (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer - a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res* 58, pp. 4117–4121.

HAIMAN CA, HANKINSON SE, SPIEGELMAN D, COLDITZ GA, WILLETT WC, SPEIZER FE, KELSEY KT, HUNTER DJ (1999). The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res* 59: 1015-1020.

HANKINSON SE, WILLETT WC, MANSON JE, COLDITZ GA, HUNTER DJ, SPIEGELMAN D, BARBIERI RL, SPEIZER FE (1998). Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 90: 1292-1299.

HAN W, PENTECOST BT, PIETROPAOLO RL, FASCO MJ, SPIVACK SD (2005). Estrogen receptor α increases basal and cigarette smoke extract-induced expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*, but not *GSTP1*, in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Carcinog* 44: 202-211.

HANNA IH, DAWLING S, ROODI N, GUENGERICH FP, PARL FF (2000). Cytochrome P450 1B1 (*CYP1B1*) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res* 60: 3440-3444.

HAYASHI S, WATANABE J, NAKASHI K, KAWAJIRI K (1991). Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 1A1 gene. *J Biochem* 110: 407-411.

HAYES CL, SPINK DC, SPINK BC, CAO QC, WALKER NJ, SUTTER TR (1996). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9776-9781.

HEFLER LA, GRIMM C, HEINZE G, HUBER JC, GITSCH G, HEFLER LA (2005). Estrogen-metabolizing gene polymorphisms and age at natural menopause in Caucasian women. *Hum Reprod* 20: 1422-1427.

HELZLSOUER KJ, HUANG HY, STRICKLAND PT, HOFFMAN S, ALBERG AJ, COMSTOCK GW, BELL DA (1998). Association between CYP17 polymorphism and the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev* 7: 945-949.

HENNINGSON M, JOHANSSON U, BORG A, OLSSON H, JERNSTRÖM H (2007). *CYP17* genotype is associated with short menstrual cycles, early oral contraceptive use and BRCA mutation status in young healthy women. *Mol Human Reprod* 13: 231-236.

HIRAKU Y, YAMASHITA N, NISHIGUCHI M, KAWANISHI S (2001). Catechol estrogens induce oxidative DNA damage and estradiol enhances cell proliferation. *Int J Cancer* 92: 333-337.

HOFFMANN H, SPEIT G (2005). Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and micronucleus test. *Mutat Res* 581: 105-114.

HUANG CS, CHERN HD, CHANG KJ, CHENG CW, HSU SM, SHEN CY (1999). Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1 and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res* 59: 4870-4875.

HUBER JC, SCHNEEBERGER C, TEMPFER CB (2002). Genetic modeling of estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders. *Maturitas* 41 (1): 555-564.

HULKA BS, MOORMAN PG (2001). Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 38:103-116.

INCA: Instituto Nacional do Câncer (2006). Home page: www.inca.gov.br

ISHIBE N, HANKINSON SE, COLDITZ GA, SPIEGELMAN D, WILLETT WC, SPEIZER FE, KELSEY KT, HUNTER DJ (1998). Cigarette smoking, cytochrome P450 1A1 polymorphisms and breast cancer risk in Nurses`Health Study. *Cancer Res* 58: 667-671.

JEFFORD EC, IRMINGER-FINGER I (2006). Mechanisms of chromosome instability in cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 59: 1-14.

JOHNSON-THOMPSON MC, GUTHRIE J (2000). Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer* 88: 1224-1229.

JUSTENHOVEN C, PIERL CB, HAAS S, FISCHER HP, BAISCH C, HAMANN U, HARTH V, PESCH B, BRÜNING T, VOLLMERT C, ILLIG T, DIPPON J, KO YD, BRAUSH H (2007). The CYP1B1_1358_GG genotype is associated with estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 6, *in press*.

KANG HJ, KIM SW, KIM HJ, AHN SJ, BAE JY, PARK SK, KANG D, HIRVONEN A, CHOE KJ, NOH DY (2002). Polymorphisms in the estrogen receptor-alpha gene and breast cancer risk. *Cancer Lett* 178: 175-180.

KLEINBAUM DG, KUPPER LL, MARGENSTERN H (1982). *Epidemiologic research: Principles and quantitative methods*. Belmont, CA: Wadsworth.

KOCABAS NA, SARDAS S, CHOLERTON S, DALY AK, KARAKAYA AE (2002). Cytochrome P450 *CYP1B1* and catechol *O*-methyltransferase (*COMT*) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population. *Arch Toxicol* 76: 643-649.

KOPJAR N, MILAS I, GARAJ-VRHOVAC V, GAMULIN M (2006). Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clin Exp Med* 6: 177-190.

KRISTENSEN NS, HARALDSEN EK, ANDERSON KB, LONNING PE, ERIKSTEIN B, KARESEN R, GABRIELSEN OS, BORRESEN-DALE AL (1999). CYP17 and breast cancer risk: the polymorphism in the 5' flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. *Cancer Res* 59: 2825-2828.

KRISTENSEN NS, BORRESEN-DALE AL (2000). Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutat Res* 462: 323-333.

KULIGINA ES, TOGO AV, SUSPITSIN EN, GRIGORIEV MY, POZHARISSKIY KM, CHAGUNAVA OL, BERNSTEIN LM, THEILLET C, HANSON KP, IMYANITOV EN (2000). CYP17 polymorphism in the groups of distinct breast cancer susceptibility: comparison of patients with the bilateral disease vs. unilateral breast cancer patients vs. middle-aged female controls vs. elderly tumor-free women. *Cancer Lett* 156: 45-50.

LACHMAN HM, PAPOLOS DF, SAITO T, YU YM, SZUMLANSKI CL, WEINSHILBOUM RM (1996). Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6: 243-250.

LANDI MT, BERTAZZI PA, SHIELDS PG, CLARK G, LUCIER GW, GARTE SJ, COSMA G, CAPORASO NE (1994). Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in human. *Pharmacogenetics* 4: 242-246.

LAVIGNE JA, HELZLSOUER KJ, HUANG HY, STRICKLAND PT, BELL DA, SELMIN O, WATSON MA, HOFFMAN S, COMSTOCK GW, YAGER JD (1997). An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and risk for breast cancer. *Cancer Res* 57: 5493-5497.

LAW MR (1990). Genetic predisposition to lung cancer. *Br J Cancer* 61: 195-206.

LICHTENSTEIN P, HOLM NV, VERKASALO PK, ILIADOU A, KAPRIO J, KOSKENVUO M, PUKKALA E, SKYTTE A, HERNMINKI K (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 343: 78-85.

LIEHR JG (1997). Hormone-associated cancer: mechanistic similarities between human breast cancer and estrogen-induced kidney carcinogenesis in hamsters. *Environ Health Perspect* 105: 565-569.

LIEHR JG (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Mutat. Res* 462: 323-333.

LIN WY, CHOU YC, WU MH, JENG YL, HUANG HB, YOU SL, CHU TY, CHEN CJ, SUN CA (2005). Polymorphic catechol-O-methyltransferase gene, duration of estrogen exposure, and breast cancer risk: a nested case-control study in Taiwan. *Cancer Detect Prev* 29: 427-432.

LOCKETT KL, HALL MC, CLARK PE, CHUANG SC, ROBINSON B, LIN HY, SU LJ, HU JJ (2006). DNA damage levels in prostate cancer cases and controls. *Carcinogenesis* 27: 1187-1193.

LONG JR, SHU XO, CAI Q, CAI H, GAO YT, JIN F, ZHENG W (2006). Polymorphisms of the *CYP1B1* gene may be associated with the onset of natural menopause in Chinese women. *Maturitas* 55: 238-246.

LOTTA T, VIDGREN J, TILGMANN C, ULMANEN I, MELEN K, JULKUNEN I, TASKINEN J (1995). Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochem* 34: 4202-4210.

MALIN BJ, MASSIMILIANO G, ANNA CL, STEN W (1999). Association between CYP17 gene polymorphism and risk of breast cancer in young women. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 84: 350-353.

MATSUI A, IKEDA T, ENOMOTO K, HOSODA K, NAKASHIMA H, OMAE K, WATANABE M, HIBI T, KITAJIMA M (2000). Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 151: 87-95.

MITRUNEN K, HIRVONEN A (2003) Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat. Res* 544: 9-41.

MIURA T, MURAOKA S, FUJIMOTO Y, ZHAO K (2000). DNA strand break and 8-hydroxyguanine formation induced by 2-hydroxyestradiol dispersed in liposomes. *J Ster Biochem Mol Biol* 74: 93-38.

MIYOSHI Y, IWAO K, IKEDA N, EGAWA C, NOGUCHI S (2000). Genetic polymorphism in CYP17 and breast cancer risk in Japanese women. *Eur J Cancer* 36: 2375-2379.

MIYOSHI Y, NOGUCHI S (2003). Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women. *Biomed Pharmac* 57: 471-481.

MODUGNO F, ZMUDA JM, POTTER D, CAI C, ZIV E, CUMMING SR, STONE KL, MORIN PA, GREENE D, CAULEY JA (2005). Estrogen metabolizing polymorphisms and breast cancer risk among older white women. *Breast Cancer Res Treat* 93: 261-270.

MOYSICH KB, SHIELDS PG, FREUDENHEIM JL, SCHISTERMAN EF, VENA JE, KOSTYNIK P, GREIZERSTEIN H, MARSHALL JR, GRAHAM S, AMBROSONE CB (1999). Polychlorinated biphenyls, cytochrome P4501A1 polymorphism and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 41-44.

NEWBOLD RR, LIEHR JG (2000). Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res* 60: 235-237.

NORPPA H (2003). Genetic susceptibility, biomarker responses and cancer. *Mutat Res* 544: 339-348.

NORPPA H (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Letters* 149: 309-343.

NORPPA H, BONASSI S, HANSTEEN IL, HAGMAR L, STROMBERG U, ROSSNER P, LINDHOLM C, GUNDY S, LAZUTKA J, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, SRAM

RJ, KNUDSEN LE, BARALE R, FUCIC A (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 600: 37-45.

ONLAND-MORET NC, van GILS CH, ROEST M, GROBBEE DE, PEETERS PH (2005). Cyp17, urinary sex steroid levels and breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 815-820.

OESTERREICH S, FUQUA SA (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 6: 405-419.

PAGES V, FUCHS RP (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* 16: 8957 – 8966.

PASTOR S, CREUS A, PARRÓN T, CEBULSKA-WASILEWSKA A, SIFFEL C, PIPERAKIS S, MARCOS R (2003). Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18: 249-258.

PRESTON RJ, SEBASTIAN Jr S, McFEE AF (1987). The in vitro human lymphocytes assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat Res* 189: 175-183.

RAJAPAKSE N, BUTTERWORTH M, KORTENKAMP A (2005). Detection of DNA strand breaks and oxidized DNA bases at the single-cell level resulting from exposure to estradiol and hydroxylated metabolites. *Environ Mol Mutag* 45: 397-404.

REBBECK TR (1999). Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer* 86: 2493-2501.

ROY D, LIEHR JG (1999). Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat Res* 424:107-115.

ROY D, CAI Q, FELTY Q, NARAYAN S (2007). Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J Toxicol Environ Health* 10: 235-257.

SAINTOT M, MALAVEILLE C, HAUTEFEUILLE A, GERBER M (2003). Interactions between genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1, sulfotransferase 1A1, catechol-O-methyltransferase and tobacco exposure in breast cancer risk. *Int J Cancer* 107: 652-657.

SARASIN A (2003). An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 544: 99-106.

SALAMA SA, SIERRA-TORRES CH, OH HY, HAMADA FA, AU WW (2001). Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo(a)pyrene. *Environ Mol Mutagen* 37: 17-26.

SHARP L, CARDY AH, COTTON SC, LITTLE J (2004). CYP17 gene polymorphisms: prevalence and associations with hormone levels and related factors. A HuGE review. *Am J Epidemiol* 160: 729-740.

SHIMADA T, WATANABE J, KAWAJIRI K, SUTTER TR, GUENGERICH FP, GILLAN EM, INOUE K (1999). Catalytic properties of polymorphic human cytochrome p450 1B1 variants. *Carcinogenesis* 20: 1607-1613.

SILLANPÄÄ P, HEIKINHEIMO L, KATAJA V, ESKELINEN M, KOSMA VM, UUSITUPA M, VAINIO H, METSOLA K, HIRVONEN A (2007). CYP1A1 and CYP1B1 genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish Caucasian population. *Breast Cancer Res Treat* 104: 287-297.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL (1988). A simple technique for quantitation of low DNA levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* 175: 184 - 191.

SMITH TR, MILLER MS, LOHMAN KK, CASE LD, HU JJ (2003). DNA damage and breast cancer. *Carcinogenesis* 24: 883-889.

SPEIT G, SCHUTZ P, BONZHEIM I, TRENZ K, HOFFMANN H (2004). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Letters* 146: 151-158.

SPINK DC, EUGSTER HP, LINCON DW, SCHUETZ JD, SCHUETZ EG, JOHNSON JA, KAMINSKY LS, GIERTHY JF (1992). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: a comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. Arch Biochem Biophys 293: 342-348.

SPINK DC, SPINK BC, CAO JQ, DEPASQUALE JA, PENTECOST BT, FASCO MJ, LI Y, SUTTER TR (1998). Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. Carcinogenesis 19: 291-298.

STOILOV I, AKARSU AN, ALOZIE I, CHILD A, BARSOUM-HOMSY M, TURACLI ME, OR M, LEWIS RA, OZDEMIR N, BRICE G, AKANS SG, CHECRETTE L, COCA-PRADOS M, SARFAZI M (1998). Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P450 1B1. Am J Hum Genet 62: 573-584.

SUCHAR LA, CHANG RL, ROSEN RT, LECH J, CONNEY AH (1995). High performance liquid chromatography separation of hydroxylated estradiol metabolites: formation of estradiol metabolites by liver chromosomes from male and female rats. J Pharmacol Exp Ther 272: 197-206.

TAIOLI E, TRACHMAN J, CHEN X, TONIOLO P, GARTE SJ (1995). A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. Cancer Res 55: 3757-3758.

TAIOLI E, BRADLOW HL, GARBERS SV, SEPKOVIC DW, OSBORNE MP, TRACHMAN L, GANGULY S, GARTE SJ (1999). Role of estradiol metabolism and CYP1A1 polymorphisms in breast cancer. Cancer Detec Prev 23: 232-237.

TANG YM, WO YYP, STEWART J, HAWKINS AL, GRIFFIN CA, SUTTER TR, GREENLEE WF (1996). Isolation and characterization of the human cytochrome P450 *CYP1B1* gene. J Biol Chem 271: 28324-28330.

TANG YM, GREEN BL, CHEN GF, THOMPSON PA, LANG PN, SHINDE A, LIN DX, TAN W, LYN-COOK BD, HAMMONS GJ, KADLUBAR FF (2000). Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese, estradiol hydroxylase activity and distribution in prostate cancer cases and controls. *Pharmacogenetics* 10: 761-766.

TCHOU J, KASAI H, SHIBUTANI S, CHUNG MH, LAVAL J, GROLLMAN AP, NISHIMURA S (1991). 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *PNAS* 88: 4690-4694.

THOMPSON PA, SHIELDS PG, FREUDENHEIM JL, STONE A, VENA JE, MARSHALL JR, GRAHAM S, LAUGHLIN R, NEMOTO T, KADLUBAR FF, AMBROSONE CB (1998). Genetic polymorphisms in catechol-*O*-methyltransferase, menopausal status, and breast cancer risk. *Cancer Res* 58: 2107-2110.

ULMANEN I, LUNDSTROM K (1991). Cell-free synthesis of rat and human catechol-*O*-methyltransferase. *Eur J Biochem* 202: 1013-1020.

VARGA D, HOEGEL J, MAIER C, JAINTA S, HOEHNE M, PATINO-GARCIA B, MICHELL I, SCHWARZ-BOEGER U, KIECHLE M, KREIENBERG R, VOGEL W (2006). On the difference of micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes between breast cancer patients and controls. *Mutagenesis* 21: 313-320.

VIJG J (2004). Impact of genome instability on transcription regulation of aging and senescence. *Mech Ageing Dev* 125: 747-753.

YIM DS, PARK SK, YOO KY, YOON KS, CHUNG HH, KANG HL, AHN SH, NOH DY, CHOE KJ, JANG IJ, SHIN SG, STRICKLAND PT, HIRVONEN A, KANG D (2001). Relationship between the Val158Met polymorphism of catechol-*O*-methyltransferase and breast cancer. *Pharmacogenetics* 11: 279-286.

WEBER BL, NATHANSON KL (2000). Low penetrance gene associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer* 36: 1193-1199.

WEN W, CAI Q, SHU XO, CHENG JR, PARL F, PIERCE L, GAO YT, ZHENG W (2005) Cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase genetic polymorphisms and breast cancer risk in Chinese women: results from Shanghai breast cancer study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 329-335.

WESTON A, PAN CF, BLEIWEISS IJ, KSIESKI HB, ROY N, MALONEY N, WOLFF MS (1998). CYP17 genotype and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 941-944.

WILD CP, LAW GR, ROMAN E (2002). Molecular epidemiology and cancer: promising areas for future research in the post-genomic era. *Mutat Res* 499: 3-12.

WOJDA A, ZIETKIEWICZ E, MOSSAKOWSKA M, PAWLOWSKI W, SKRZYPEZAK K, WITT M (2006). Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors. *J Gerontol* 61: 763-772.

ZHENG W, DA-WEN X, JIN F, JIA-RONG C, DAI Q, WAN-QIG W, SHU XO, GAO YT (2000). Genetic Polymorphism of Cytochrome P450-1B1 and Risk os Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 9: 147-150.

ZHU BT, CONNEY AH (1998). Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 19: 1-27.

ZUBER MX, SIMPSON ER, WATERMAN MR (1986). Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in non-steroidogenic (COS 1) cells. *Science* 234: 1258-1261.



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 15 de abril de 2004

Ofício nº 1020/2004
CEP/CDGC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado **“ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM MULHERES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 177ª Reunião Ordinária realizada em 12/04/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 11604/2003. Lembramos que devem ser encaminhados a este CEP relatórios semestrais e relatório final da pesquisa.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.


PROFª DRª CLARISSE DULCE G. CARVALHEIRO
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
RAQUEL ALVES DOS SANTOS
PROFª DRª CATARINA SATIE TAKAHASHI (Orientadora)
Depto. de Genética – FMRP-USP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº1217/2004

Registro CONEP: 10131 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0321.0.004.000-03

Processo nº 25000.054097/2004-33

Projeto de Pesquisa: " *Estudo citogenético e molecular em mulheres portadoras de câncer de mama.* "

Pesquisador Responsável: Raquel Alves dos Santos (doutoranda)

Profª. Drª. Catarina Satie Takahashi (orientadora)

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Depto de Ginecologia e Obstetrícia

Área Temática Especial: Genética Humana

Ao se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 1033/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a- Foram atendidas as solicitações do referido parecer. O TCLE foi devidamente modificado.
- b- O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.
- c- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 14 de julho de 2004.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Data P.A.: ___/___/___

Data do Retorno: ___/___/___

Data da Coleta: ___/___/___

REGISTRO: _____ PACIENTE CONTROLE CÓDIGO: _____

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ IDADE: _____ NACIONALIDADE: _____

LOCAL DE NASCIMENTO: _____

ENDEREÇO ATUAL: _____

TELEFONE P/ CONTATO: _____

CIDADE: _____ ETINIA: _____

MENARCA: _____ MENOPAUSA: _____

FAZ USO DE HORMÔNIOS: () SIM () NÃO QUAIS?: _____

TEMPO DE USO DE HORMÔNIOS: _____

Nº DE FILHOS: _____ Nº DE GRAVIDEZES: _____

IDADE DA 1ª GESTAÇÃO: _____

JÁ TEVE ALGUM TIPO DE CÂNCER?: () SIM () NÃO
QUAL?: _____

JÁ FEZ QUIMIOTERAPIA?: () SIM () NÃO POR QUANTO TEMPO?: _____

POSSUI CASOS DE CÂNCER NA FAMÍLIA (tipo de grau de parentesco): _____

FUMA?: () SIM () NÃO HA QUANTO TEMPO?: _____ Nº DE CIGARROS/DIA: _____

JÁ FUMOU?: () SIM () NÃO POR QUANTO TEMPO: _____

HÁ QUANTO TEMPO PAROU DE FUMAR?: _____

CONVIVE COM PESSOAS QUE FUMAM?: () SIM () NÃO

É ETILISTA?: () SIM () NÃO HÁ QUANTO TEMPO?: _____ QUANTO

BEBE POR DIA?: _____

FAZ USO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES: () SIM () NÃO QUAIS?:_____

HÁ QUANTO TEMPO?:_____

FAZ USO DE MEDICAMENTOS: () SIM () NÃO QUAIS?:_____

FAZ OU JÁ FEZ USO DE DROGAS ILÍCITAS: () SIM () NÃO POR QUANTO TEMPO?_____

TEVE ALGUMA VIROSE RECENTEMENTE?: () SIM () NÃO HÁ QUANTO TEMPO FOI CURADO?:_____

VOCÊ FOI SUBMETIDO A ALGUMA RADIOGRAFIA RECENTEMENTE?: () SIM () NÃO HÁ QUANTO TEMPO ATRÁS?:_____

MOTIVO DE ENTRADA NO AMBULATÓRIO DA MASTOLOGIA:_____

TIPO DE TUMOR (classificação histopatológica):_____

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)