



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



**POLIMORFISMOS NOS GENES XRCC1 E XRCC3 E A RESPOSTA AOS DANOS  
INDUZIDOS NO DNA PELO ETOPOSIDO EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
MAMA**

*Ana Claudia Teixeira*

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências, área de concentração:  
Genética.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Catarina Satie Takahashi

RIBEIRÃO PRETO - SP

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

TEIXEIRA, Ana Claudia

Polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* e a resposta aos danos induzidos no DNA pelo Etoposido em pacientes com câncer de mama.

Ribeirão Preto, 2008.

69pp. 28 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Genética.

Orientador: Takahashi, Catarina Satie

### **Apoio e Suporte Financeiro**

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP (Processo nº 06/52225-2)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo nº 400887/2005-3)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/ USP – FAEPA – HCRP
- 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- HCFMRP/USP

**"Saber não é suficiente; devemos aplicar.  
Querer não é suficiente; devemos fazer."  
(Johan Wolfgang Von Goethe)**

**"A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria."  
(Will Durant)**

*Dedico,*

*Aos meus pais Antonio Carlos e Dalva,*

Nada que eu diga aqui conseguirá expressar minha gratidão. O que sou hoje devo à vocês, que sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio necessário para que eu chegasse até aqui. Mais uma etapa cumprida e dedico essa conquista à vocês. Obrigada pelos ensinamentos de vida, pelos conselhos, por confiarem em mim, torcerem pelo meu sucesso e principalmente pelo amor incondicional... AMO VOCÊS ACIMA DE QUALQUER COISA!!!

*A minha irmã Alessandra,*

Minha melhor amiga, confidente, minha companheira. Tenha certeza que você foi essencial para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelo seu amor, carinho, apoio e por estar sempre ao meu lado. AMO MUITO VOCÊ!

*A minha inesquecível avó Maria,*

A saudade dói, mas tenho certeza que a senhora, de onde está, se orgulha de mim por mais esta etapa cumprida. Obrigada por ter sido uma avó maravilhosa! As boas lembranças são o meu conforto. ESTARÁ PARA SEMPRE NO MEU CORAÇÃO!

## AGRADECIMENTOS

**Agradeço,**

À **Deus**, força maior na minha vida, que na sua infinita grandeza e generosidade, me permitiu conduzir e concluir este trabalho.

À minha orientadora **Profª. Drª. Catarina Satie Takahashi**, pela oportunidade que me deu em ingressar no mundo da pesquisa, pelo apoio, pela confiança depositada e pelos ensinamentos tão importantes para a minha formação pessoal e profissional. Muito obrigada!

À **Profª. Drª. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, pela amizade, tanto dentro do laboratório, quanto fora dele, pelas conversas, conselhos importantes e por torcer por mim pessoalmente e profissionalmente. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade**, pela simpatia que me recebeu no ambulatório e pela preciosa ajuda na execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Hélio H. A. Carrara**, pelo carinho e simpatia que me recebeu, por todos os ensinamentos importantes e pela colaboração imprescindível neste trabalho.

À **Profª. Drª. Nilce Martinez Rossi**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP, pela atenção e apoio despendidos.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP, pela dedicação em promover o crescimento e a qualidade do curso.

À **Profª. Drª. Lúcia Martelli**, ex-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP, tão empenhada na luta da qualidade do curso.

Aos **Membros da Banca Examinadora**, por sua disposição e paciência em analisar este trabalho e trazer importantes contribuições.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana R. P. Nalon** e **Maria Aparecida O. S. Elias** pela ajuda, atenção e pela amizade que criamos.

Às enfermeiras e auxiliares administrativos do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, **Ana Lúcia, Élica, Márcia, Leuda, Tânia, Ângela, Maria Helena, Rita, Fabiana, Alaíde, Cida, Sílvia, Irma, Fátima e Lucimar**, por toda ajuda, atenção e pelo carinho.

Aos médicos do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, **Dr. William Simões, Dr. Renato, Dr. Rodrigo, Dr. Frankiln, Dr. Vitor, Dr. Luis Gustavo, Dr<sup>a</sup>. Stefânia, Dr<sup>a</sup>. Viviane, Dr. Fábio, Dr. Joaquim, Dr. Philbert, Dr<sup>a</sup>. Fernanda** pela ajuda imprescindível nas coletas.

Ao **Dr. Ângelo Mathes** e sua esposa **Heloísa Mathes**, por toda ajuda prestada, pelo carinho, pela amizade e pelas conversas agradáveis.

À todas as **pacientes**, que mesmo nas horas mais difíceis, aceitaram participar da pesquisa. Vocês são exemplos de mulheres fortes. E também as **doadoras**, que gentilmente aceitaram participar como controles. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao **Luiz Augusto da Costa Júnior**, carinhosamente chamado de “Juca”, técnico do Laboratório de Citogenética, por toda a ajuda prestada, pelos bons momentos, mas principalmente pela amizade. Muito obrigada Juquinha pelas conversas, pelos conselhos e risadas. Ah, tudo isso, lógico, quando não estava no telefone. Conquistei um grande amigo.

À querida **Sueli Aparecida Neves**, técnica do Laboratório de Citogenética, pelos ensinamentos, por toda ajuda prestada, pelas risadas, pela canjica deliciosa e pela amizade.

À **Dr<sup>a</sup>. Raquel Alves do Santos**, minha amiga querida. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão. Desde o primeiro dia em que cheguei no laboratório me recebeu com carinho e me ensinou grande parte do que hoje sei. Obrigada pela maravilhosa amizade, pela ajuda imprescindível no meu trabalho, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório e pelo carinho incondicional.

À **Aline Poersch**, a outra loira do laboratório, minha amiga e companheira nas coletas do ambulatório e no trabalho de bancada. Agradeço pela amizade, pela fundamental ajuda para a realização deste trabalho, pelo carinho, pelas risadas, pelos momentos divertidos dentro e



fora do laboratório e por todas as “guloseimas” maravilhosas que fez. Espero tê-la sempre na minha vida daqui para frente.

À **Dr<sup>a</sup>. Mônica Beatriz Mayorano**, pela ajuda em desvendar o mundo “molecular”, pela amizade, pelos deliciosos alfajores trazidos da Argentina e pelos bons momentos no laboratório e fora dele.

Ao **Douglas Vinicius N. P. O.**, um amigo para todas as horas, pelo carinho e bons momentos compartilhados nestes anos de laboratório.

À todo o pessoal do Laboratório de Citogenética e Mutagênese. Aos que já passaram: **Carmen, Carla, Cássia, Cleide, Douglas, Gilmara, Gustavo, Juliana, Marcelo, Marjori, Maria Sol, Maria Clara, Mônica e Stephano**; e aos que me acompanharam: **Adriana, Aline, Ana Paula, Cristiano (Profeta), Danilo (Xitão), Danillo (Bollor), Giovana, Gustavo, Igor (Primal), Léo, Leonardo, Flávia, Paulo (Cop), Patrícia, Raquel, Vinícius**, obrigada pelo ótimo convívio!

Ao meu querido amigo **Daniel Macedo Jorge**, pela amizade, pelas conversas, conselhos, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório e pela grande ajuda nos momentos que precisei. Obrigada por tudo! Conquistei um grande amigo. Obrigada também por trazer a **Luiza** para fazer parte da minha vida.

Aos colegas do laboratório de Bioinformática: **Gabriela, Breve, Luciano, Renato e Saulo**, sempre presentes nas festinhas do nosso laboratório, pela amizade, carinho e ajuda.

Ao meu querido **Leandro**, pelo carinho, apoio, cumplicidade, pelos ótimos momentos juntos e pelas longas e agradáveis conversas nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos fora do âmbito do laboratório, uns próximos, outros mais distantes, mas que nunca deixaram de me apoiar e torcer por mim.

Aos meus **tios e primos**, sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente me ajudaram em alguma etapa deste trabalho e da minha vida, meu muito obrigada!

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Câncer de Mama: aspectos gerais e fatores de risco	1
1.2 Genes de reparo	3
1.3 Mutagênese, carcinogênese e a importância dos biomarcadores de efeito e de suscetibilidade	8
<b>2. OBJETIVOS</b>	10
2.1 Geral	10
2.2 Específicos	10
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b>	11
3.1 Casuística	11
3.2 Avaliação citogenética	12
3.2.1 Etoposido	13
3.2.2 Citocalasina B	13
3.2.3 Tratamentos realizados	13
3.2.4.a Teste do Micronúcleo	14
3.2.4.b Análise estatística	15
3.2.5.a Ensaio Cometa	16
3.2.5.b Análise estatística	18
3.3 Análise molecular	18
3.3.1 Extração e quantificação de DNA genômico	18
3.3.2 Amplificação das seqüências de DNA por PCR	19
3.3.3 Detecção dos polimorfismos por PCR-RFLP	20
3.3.4 Análise estatística	22
<b>4. RESULTADOS</b>	23
4.1 Caracterização geral da amostra de pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis estudadas	23
4.2 Análise da extensão dos níveis de danos basais e induzidos de lesões no DNA detectadas pelo Índice de Divisão Nuclear (IDN), Teste do Micronúcleo (MN) e Ensaio Cometa	26
4.3 Análise da frequência dos polimorfismos nos genes XRCC1 e XRCC3 na amostra utilizada na avaliação citogenética	38
4.4 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes XRCC1 e XRCC3 em pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis	40
<b>5. DISCUSSÃO</b>	45
5.1 Danos basais e induzidos no DNA em pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis	45
5.2 Os polimorfismos dos genes XRCC1 e XRCC3 e a suscetibilidade ao câncer de mama	51
<b>6. CONCLUSÕES</b>	54

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	56
<b>ANEXOS</b>	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

BER - reparo por excisão de bases

CBMN – célula binucleada micronucleada

CM – câncer de mama

DMSO – dimetilsufóxido

DNA – ácido desoxiribonucleico

DP – desvio padrão

DSBs- quebras de fita dupla

DV – desvio padrão

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

IC – intervalo de Confiança

IDN – índice de divisão nuclear

M – molar

mg – miligrama

mM – milimolar

MN – micronúcleo

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

nm – nanômetros

OR – “odds ratio”

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia polimerase

q.s.p – quantidade suficiente para

RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

r.p.m – rotações por minuto

X – média

$\mu\text{L}$  – microlitros

$\mu\text{M}$  – micromolar

$\mu\text{g}$  - microgramas

V – volts

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise citogenética e molecular.....12
- Tabela 2.** Seqüências iniciadoras e condições de reação para amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *XRCC1* e *XRCC3*.....19
- Tabela 3.** Condições de temperatura e tempo para amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *XRCC1* e *XRCC3*.....20
- Tabela 4.** Caracterização geral da amostra de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise citogenética e molecular quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca, presença ou ausência da menopausa, uso de hormônios como contraceptivo oral ou terapia de reposição hormonal, idade da primeira gestação e parentesco com pessoas com câncer.....24
- Tabela 5.** Caracterização geral da amostra de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise citogenética quanto à idade, ao hábito tabagista, à idade da menarca, a presença ou ausência da menopausa, ao uso de hormônios como contraceptivo oral ou terapia de reposição hormonal, a idade da primeira gestação e ao parentesco com pessoas com câncer.....25
- Tabela 6.** Médias dos Índices de Divisão Nuclear (IDN) observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....28
- Tabela 7.** Frequência média de micronúcleos observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....28
- Tabela 8.** Frequência média de micronúcleos observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, considerando diferentes faixas etárias. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.....29

**Tabela 9.** Frequência média de micronúcleos observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, considerando hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.....30

**Tabela 10.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura no Ensaio Cometa, submetidos a diferentes tratamentos, *in vitro*, com Etoposido e seu respectivo controle. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo em cada tempo (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>) do experimento.....31

**Tabela 11.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação a idade ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos). Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....32

**Tabela 12.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação a idade ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos). Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....33

**Tabela 13.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação a idade ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos). Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....34

**Tabela 14.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação ao hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....35

**Tabela 15.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle,

divididos em relação ao hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....36

**Tabela 16.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação ao hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.....37

**Tabela 17.** Frequência dos genótipos das amostras utilizadas no Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa em relação aos polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3*. .....39

**Tabela 18.** Distribuição das frequências alélicas das amostras utilizadas no Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa em relação aos polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3*.....39

**Tabela 19.** Distribuição e comparação das frequências genotípicas dos genes *XRCC1* e *XRCC3* em pacientes com CM e mulheres saudáveis.....41

**Tabela 20.** Distribuição das frequências alélicas dos genes *XRCC1* e *XRCC3* nas amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis.....41

**Tabela 21.** Diferentes associações entre os genótipos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* nas amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise molecular de acordo com o hábito tabagista.....43

**Tabela 22.** Diferentes associações entre os genótipos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* nas amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise molecular de acordo com o parentesco com pessoas com câncer.....44



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de reparo por excisão de base.....4
- Figura 2.** Mecanismo de reparo recombinacional homólogo.....5
- Figura 3.** Estrutura química do Etoposido.....5
- Figura 4.** Célula normal (A) e binucleada micronucleada (B) obtida pelo Teste do Micronúcleo em linfócitos de sangue periférico de uma paciente com câncer de mama. Aumento 40X..... 15
- Figura 5.** Nucleóide íntegro (A) e em forma de cometa (B) obtido pelo Ensaio Cometa em linfócitos de sangue periférico de paciente com câncer de mama.....18
- Figura 6.** PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *XRCC1* G → A no códon 399 detectado pela enzima *MspI*, onde M = marcador de peso molecular (50 pb). Coluna 1: homocigoto para o alelo mais freqüente (*Arg/Arg*). Coluna 2: heterocigoto (*Arg/Gln*). Coluna 3: homocigoto para o alelo menos freqüente (*Gln/Gln*).....21
- Figura 7.** PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *XRCC3* C → T no códon 241 detectado pela enzima *NlaIII*, onde M = marcador de peso molecular (50 pb). Coluna 1: homocigoto para o alelo mais freqüente (*Thr/Thr*). Coluna 2: heterocigoto (*Thr/Met*). Coluna 3: homocigoto para o alelo menos freqüente (*Met/Met*).....22

## RESUMO

Apesar de intensivos estudos e substanciais progressos no entendimento dos fatores de risco e suscetibilidade ao câncer de mama (CM), esta neoplasia permanece como importante causa de morte entre mulheres. Idade, história familiar, menarca precoce, menopausa tardia, ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos e da nuliparidade constituem fatores de risco. Além disso, polimorfismos nos genes envolvidos no reparo de danos no DNA, como os genes *XRCC1* e *XRCC3*, podem contribuir para o aumento da suscetibilidade ao CM. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar pelo Teste do MN e Ensaio Cometa os danos basais e a resposta celular aos danos induzidos, *in vitro*, no DNA pelo quimioterápico Etoposido em pacientes com CM, virgens de qualquer tipo tratamento e em mulheres saudáveis utilizadas como controles e além disso, estabelecer as frequências dos polimorfismos nos genes *XRCC1* e *XRCC3* na amostra de pacientes com CM e em mulheres saudáveis e associação destes dois polimorfismos com a suscetibilidade ao CM. No Teste do MN, foi observada uma sensibilidade maior do grupo de pacientes aos danos induzidos pelo Etoposido. O Ensaio Cometa mostrou que pacientes e mulheres saudáveis respondem de modo semelhante ao tratamento com o Etoposido. Também foi observado que pacientes acima de 45 anos apresentaram um grau maior de sensibilidade aos danos induzidos pelo Etoposido na concentração de 25  $\mu\text{M}$  quando comparadas com pacientes abaixo de 45 anos avaliadas no Ensaio Cometa. Quanto ao hábito tabagista, este se mostrou um fator de contribuição ao aumento de sensibilidade a indução de danos pelo Etoposido no Ensaio Cometa no grupo de mulheres saudáveis, para os tratamentos com esta droga nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$ . Na análise molecular, o alelo variante *241Met* do gene *XRCC3* mostrou-se mais freqüente no grupo de pacientes tanto na amostra estudada na análise citogenética quanto na amostra estudada na análise molecular, sugerindo uma diminuição da capacidade de reparo destas pacientes, o que poderia conferir um risco aumentado ao CM. Quanto ao hábito tabagista, somente as pacientes não

fumantes, portadoras do alelo *241Met* do gene *XRCC3*, possuem um risco aumentado para o CM. Não foi encontrada associação do polimorfismo *Arg399Gln* do gene *XRCC1* com o risco ao CM mesmo quando associado à fatores de risco como hábito tabagista e a presença de familiares com câncer.

## ABSTRACT

“*XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms and the response Etoposide-induced DNA damage in breast cancer patients”

In spite of intensive studies and substantial improvements in the understanding of the risk factors and breast cancer (BC) susceptibility, this neoplasia remains as an important cause of death among women worldwide. Age, family history of cancer, early menarche, late menopause, the first pregnancy after the age of 30 years and nulliparity are BC risk factors. Furthermore genetic polymorphisms in repair genes like *XRCC1* and *XRCC3* could contribute to increase BC risk. The aims of the present study were to evaluate, by Micronucleus Test and Comet Assay, the basal damage and the cellular response to DNA damage induced by Etoposide, *in vitro*, in BC patients without chemotherapy treatment and in healthy women. Also establish the frequencies of polymorphisms of *XRCC1* and *XRCC3* genes in this sample and the association of these two polymorphisms with the susceptibility to BC. In the Micronucleus Test it was observed increased sensibility to DNA damage induced by Etoposide in patients group. Patients and healthy women exhibited the same repair capacity to DNA damage induced by Etoposide when evaluated by Comet Assay. Patients > 45 years old showed more sensibility to DNA damage induced by Etoposide (25  $\mu$ M) when were compared with patients  $\leq$ 45 years old in Comet Assay. Tobacco habits contributed to increased sensibility to damage induced by Etoposide in Comet Assay in healthy women group when treated with Etoposide in 10 and 25  $\mu$ M. In the molecular analysis, the *XRCC3 241Met* allele was more frequent in patients group in both analysis (cytogenetic and molecular) suggesting a low repair capacity of DNA damage and consequently increase risk to BC. Non-smokers patients, carriers of *XRCC3 241Met* allele showed an increased risk to BC. The polymorphism *Arg399Gln* in *XRCC1* gene was not associated with BC risk even if associated with risk factors like tobacco habit and family history of cancer.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer de Mama: aspectos gerais e fatores de risco

O câncer de mama (CM) é provavelmente a neoplasia mais temida pelas mulheres devido à sua alta frequência de ocorrência. Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico e nos tratamentos na última década terem contribuído para a sobrevivência de pacientes com câncer, o CM continua sendo a maior causa de morte entre mulheres (Teng *et al.*, 2007).

Pesquisas recentes sugerem que uma entre oito mulheres irá desenvolver CM em alguma etapa de sua vida e a estimativa anual de incidência dessa doença no mundo é de 1 milhão de casos (Jemal *et al.*, 2002). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008), o número de casos novos esperados em 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o CM é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 68 casos novos a cada 100 mil mulheres e, pontualmente, para o estado de São Paulo, é de 72,52 casos novos a cada 100 mil mulheres.

Muitos fatores contribuem para a variação na incidência de CM. Baseados em estudos epidemiológicos da doença conduzidos em diferentes populações, os prováveis fatores de risco para essa neoplasia são: idade, eventos reprodutivos (menarca, menopausa, gravidez e amamentação), hormônios exógenos (terapia de reposição hormonal e contraceptiva oral), hábitos de vida (bebidas alcoólicas, dieta, obesidade, sedentarismo e tabagismo), histórico de câncer familiar, exposição aos agentes ambientais como a poluição, causada pelo desenvolvimento industrial e fatores genéticos (genes de alta e baixa penetrância relacionados à suscetibilidade ao CM) (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Entre estes fatores de risco citados, a história familiar é o mais bem estabelecido. Sabe-se que uma mulher com história familiar de câncer de mama, apresenta um aumento de até duas vezes no risco de desenvolver essa neoplasia (Hulka e Moorman, 2001).

Quanto aos fatores genéticos, estima-se que somente 5% dos casos de CM estão relacionados com mutações raras, mas em genes de alta penetrância como *BRCA1* e

*BRCA2* (Oldenburg *et al.*, 2007). Isto sugere que genes de baixa penetrância, que conferem suscetibilidade ao câncer, contribuem para uma grande proporção de casos de CM (Loizidou *et al.*, 2008). Com relação aos genes de baixa penetrância, os candidatos mais importantes seriam aqueles que medeiam uma gama de funções, como os genes de reparo do DNA, os de metabolismo, os de controle do ciclo celular e os de transdução de sinais (Weber e Nathanson, 2000).

Os polimorfismos genéticos são variações na seqüência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição, e freqüentemente, estão associados a apenas uma base. A freqüência de alelos heterozigotos para o polimorfismo genético ocorre em mais de 2% da população. Algumas dessas alterações ocorrerão em seqüências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções; outras ocorrerão em seqüências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos, o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (Lodish *et al.*, 2002).

## 1.2 Genes de reparo

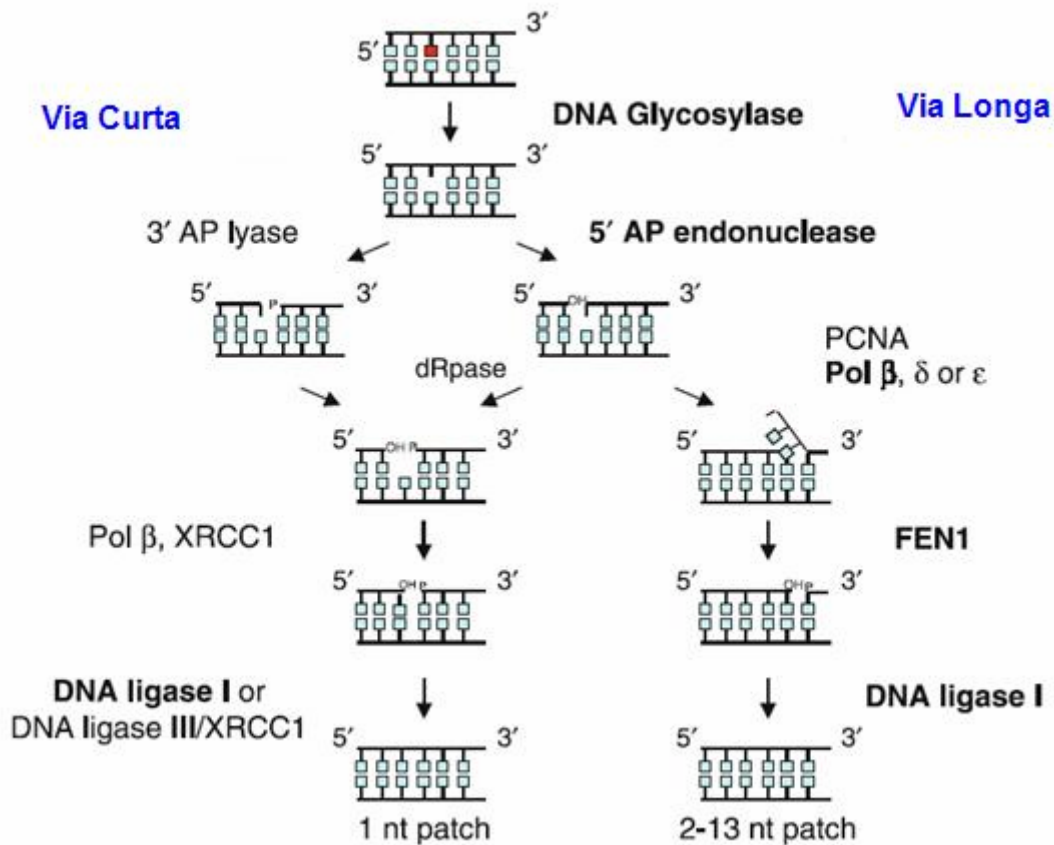
A integridade do genoma é mantida por mecanismos capazes de reconhecer e reparar danos na molécula de DNA. Estes mecanismos são constituídos por complexos enzimáticos que monitoram os cromossomos corrigindo nucleotídeos danificados (Wood *et al.*, 2001). Muitas destas alterações são causadas por agentes mutagênicos endógenos, incluindo espécies reativas de oxigênio, bem como erros originados do processo de replicação, recombinação e do próprio reparo em si. Entretanto, diversas alterações são resultantes da interação do DNA com uma variedade de compostos físicos, químicos e biológicos, muitos dos quais estão presentes no ambiente, onde o homem pode permanecer em exposição contínua à eles (Lindahl, 2000).

O reparo do DNA é essencial para a manutenção da integridade genômica. Sendo assim, deficiências nas vias de reparo levam à instabilidade genética que pode acarretar no desenvolvimento do câncer. Recentemente, vários estudos associaram o CM familiar e esporádico com o reparo do DNA, sugerindo que a redução na capacidade de reparar danos pode ser geneticamente determinada, conferindo suscetibilidade ao CM (Roberts *et al.*, 1999; Khanna e Jackson, 2001; Smith *et al.*, 2003). Os polimorfismos em genes de reparo do DNA são eventos comuns, e alguns estudos mostraram o efeito significativo de muitos desses polimorfismos na capacidade de reparar danos no DNA, contribuindo dessa forma para a diferença entre indivíduos (Pachkowski *et al.*, 2006).

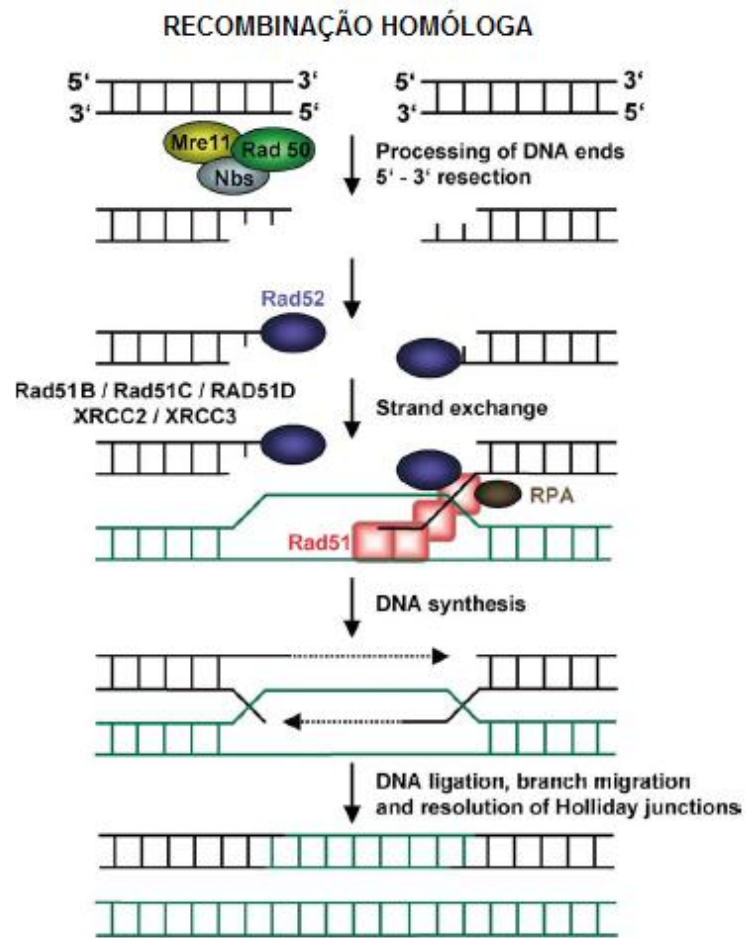
Em células de mamíferos, as quebras de fita simples são reparadas predominantemente pelo reparo por excisão de base (BER) (Figura 1) (Cline e Hanawalt, 2003). As quebras de fita dupla (DSBs) são reparadas, principalmente, por duas vias distintas de reparo: reparo não-homólogo e reparo por recombinação homóloga (HR) (Figura 2) (West, 2003). As DSBs representam as lesões mais prejudiciais uma vez que acarretam em morte celular ou perda de material genético (Costa *et al.*, 2007). As células respondem a tais quebras induzindo a parada do ciclo celular, seguido do reparo do DNA e/ou morte celular por apoptose (Christmann *et al.*, 2003; Rafii *et al.*, 2003). Um grande número de



agentes físicos e químicos, como o quimioterápico Etoposido (Figura 3) induzem DSBs. Este antineoplásico semi-sintético é derivado da resina do *Podophyllum peltatum*, conhecido como inibidor de topoisomerase II, atua na fase S/G2 do ciclo celular e em uma grande variedade de tumores.

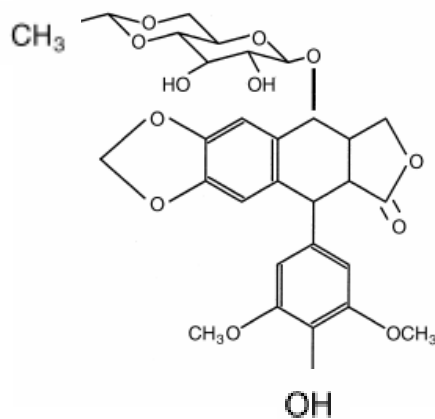


**Figura 1.** Mecanismo de reparo por excisão de base



*Modificado de Christmann et al., 2003*

**Figura 2.** Mecanismo de reparo recombinacional homólogo



*Modificado de Baguley e Ferguson, 1998*

**Figura 3.** Estrutura química do Etoposido

O Etoposido se liga ao complexo DNA - Topoisomerase II, estabilizando-o. Esta estabilização ocorre após o estágio de corte do DNA e antes deste ser recomposto. Portanto, o DNA e a enzima não podem prosseguir com suas funções normais e, assim, a progressão do ciclo celular é impedida, resultando num acúmulo de DSBs (Silva, 2003).

A variação no reparo do DNA observada na população pode ser decorrente dos polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) que, freqüentemente, têm sido detectados em genes envolvidos nas vias de reparo tanto do BER quanto do HR, contribuindo, dessa forma, para a suscetibilidade ao CM (Thyagarajan *et al.*, 2006). Os genes "X-Ray Repair Cross Complementing" são importantes componentes de várias vias do reparo do DNA e contribuem para a estabilidade genômica (Thacker e Zdzienicka, 2003).

O gene "X-Ray Repair Cross Complementing 1" (*XRCC1*), contém 17 éxons, localiza-se em 19q13.2-q13.3 e codifica a proteína XRCC1 envolvida no BER (Thompson *et al.*, 1989). O BER é responsável por identificar e remover danos no DNA, como bases oxidadas ou alquiladas, surgidos espontaneamente na célula ou da exposição aos agentes exógenos como as radiações ionizantes e a luz UV (Christmann *et al.*, 2003). A proteína XRCC1 pode ligar-se diretamente tanto ao DNA clivado quanto ao DNA clivado associado com a DNA polimerase  $\beta$ , sugerindo que esta proteína pode estar independentemente envolvida no reconhecimento do dano no DNA (Duarte *et al.*, 2005). Além disso, interage com a PARP-1 (poli ADP-ribose polimerase), com a DNA ligase III e também com a APE1 e a PNK. Desta forma, a proteína XRCC1 atua como facilitadora e coordenadora do processo de reparo por excisão de base, sendo imprescindível na formação do complexo com as demais proteínas (Caldecott, 2003).

Apesar de muitos polimorfismos terem sido documentados, o polimorfismo *Arg399Gln* no *XRCC1* (troca dos nucleotídeos G  $\rightarrow$  A) tem mostrado alteração na capacidade de reparo do DNA em muitos estudos fenotípicos e, assim, recebido considerável atenção. Por causa do seu importante papel no BER, a variabilidade na expressão do *XRCC1* tem sido extensivamente estudada em relação a várias doenças,

inclusive ao CM. A variante *399Gln* mostrou-se relacionada com a redução na capacidade do BER (Matullo *et al.*, 2001).

O sistema de reparo por HR preserva a integridade cromossômica durante a replicação do DNA contribuindo para a remoção de DBSs (Yamada *et al.*, 2004). Durante o HR, a molécula de DNA danificada estabelece uma sinapse ou pareamento com a molécula de DNA intacta, compartilha a extensiva homologia da seqüência, e assim recupera a informação genética (Jackson, 2002). O gene "X-Ray Repair Cross Complementing 3" (*XRCC3*) está mapeado em 14q32.3 (Tebbs *et al.*, 1995) e codifica a proteína *XRCC3* que desempenha um importante papel na HR, interagindo com *RAD-51*, mantendo a estabilidade cromossômica e reparando o dano no DNA (Karran, 2000). A proteína *XRCC3* parece atuar na fase inicial da recombinação homóloga na qual procura por homologia na molécula não danificada e invade a cadeia para a síntese de DNA (Bishop *et al.*, 1998), podendo participar também dos últimos eventos de recombinação, auxiliando a estabilização do complexo de nucleoproteínas e a formação de DNA heteroduplex (Brenneman *et al.*, 2002). O polimorfismo *XRCC3 Thr241Met*, localizado no éxon 7, caracteriza-se pela substituição de timina por citosina no códon 241, levando a troca do aminoácido treonina (Thr) por metionina (Met), podendo afetar a função da enzima e/ou sua interação com outras proteínas envolvidas no reparo de danos no DNA (Matullo *et al.*, 2001). Alguns estudos têm relacionado esta variante com alguns tipos de câncer, como o de mama (Smith *et al.*, 2003), de pulmão (Jacobsen *et al.*, 2004) e o melanoma de pele (Winsey *et al.*, 2000).

Dada a complexidade da atuação das proteínas codificadas pelos genes *XRCC1* e *XRCC3* no sistema de reparo do DNA, é de fundamental importância avaliar os efeitos funcionais dos polimorfismos moleculares destes genes e suas conseqüências na suscetibilidade ao CM.

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

Como em muitas doenças, o desenvolvimento do CM é um processo multifatorial. O início e progresso da doença dependem da integração de eventos distintos. Esses eventos são: 1) o meio-ambiente e as exposições subseqüentes que a mulher sofre por toda sua vida, 2) suscetibilidade genética aos agentes ambientais, 3) tempo crítico de exposição ambiental (Johnson-Thompson e Guthrie, 2000).

Muitos fatores ambientais têm sido associados ao risco de desenvolvimento do CM como, por exemplo, as radiações ionizantes e compostos químicos carcinogênicos presentes na dieta e no meio ambiente (DeBruin e Josephy, 2002). Estas fontes de mutação, juntamente com outras fontes endógenas e exógenas, produzem uma vasta gama de lesões no DNA como espécies reativas de oxigênio, bases oxidadas, aductos de DNA e quebras de fita (Johnson-Thompson e Guthrie, 2000).

As células de mamíferos evoluíram para reparar diferentes tipos de danos no DNA com o objetivo de manter a integridade do genoma. Assim, a capacidade de reparo do DNA determina a suscetibilidade celular às substâncias endógenas e exógenas (Costa *et al.*, 2007). Muitos estudos têm demonstrado uma forte associação entre elevados níveis de danos do DNA e baixa capacidade de reparo em pacientes com CM e em mulheres saudáveis com histórico familiar de CM (Jyothish *et al.*, 1998; Helzlsouer *et al.*, 1996).

Alterações citogenéticas em culturas de linfócitos de sangue periférico humano, como aberrações cromossômicas (ACs), trocas entre cromátides irmãs (TCI) e micronúcleo (MN), têm sido por muitos anos utilizados como biomarcadores de exposição a agentes genotóxicos e para observação de efeitos dos mesmos (Albertini *et al.*, 2000).

A medida de frequência de MN em linfócitos de sangue periférico é extensivamente utilizada em citogenética e em estudos epidemiológicos moleculares para avaliar a presença e a extensão de danos cromossômicos em populações expostas a agentes genotóxicos, ou que tenham um perfil genético suscetível (Fenech *et al.*, 1999). Esse ensaio tem sido

aplicado com sucesso para identificar fatores genéticos que tenham um impacto significativo na instabilidade genômica (Kimura *et al.*, 2004). A alta confiabilidade e o baixo custo da técnica de MN têm contribuído para o sucesso global e para utilização deste biomarcador nos estudos *in vitro* e *in vivo* de danos genômicos (Bonassi *et al.*, 2005). 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 (Bonassi *et al.*, 2000).

Uma maior atenção tem sido dada aos polimorfismos genéticos que modulam a resposta humana aos danos causados por agentes genotóxicos (Norppa, 2004). 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 os biomarcadores de dano no DNA com o risco ao câncer (Fenech, 2002).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Uma vez que existe a hipótese do mau-funcionamento do mecanismo de reparo estar envolvido com a carcinogênese mamária, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a frequência dos polimorfismos nos genes *XRCC1* e *XRCC3*, envolvidos no reparo do DNA e avaliar os danos basais e a resposta celular aos danos induzidos no DNA, *in vitro*, pelo quimioterápico Etoposido em linfócitos de sangue periférico de pacientes com câncer de mama, virgens de tratamento quimio/radioterápico.

### 2.2 Específicos

\* avaliar os danos basais e a resposta celular aos danos induzidos, *in vitro*, no DNA pelo quimioterápico Etoposido em pacientes com câncer de mama, virgens de qualquer tipo tratamento e em mulheres saudáveis, utilizadas como controles.

\* estabelecer as frequências dos polimorfismos nos genes *XRCC1* e *XRCC3* na amostra de mulheres com câncer de mama e em mulheres saudáveis, utilizadas como controles.

\* avaliar a influência dos polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* na suscetibilidade ao câncer de mama.



**MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

Para a análise citogenética o estudo foi realizado em amostras de sangue periférico de 20 pacientes diagnosticadas com câncer de mama do tipo ductal invasor 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, segundo critérios clínicos e anátomo-patológicos. Neste estudo também se utilizou um grupo controle composto por 20 mulheres 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 ausência de tumores ou outras lesões malignas nas mamas. Tanto o grupo das pacientes como o grupo de mulheres saudáveis foi composto por voluntárias na faixa etária de 25 a 70 anos de idade, sendo a média de idade das pacientes 50,0 anos e das mulheres saudáveis 45,3 anos. A coleta de sangue de cada doadora foi feita logo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver Anexos). O projeto de pesquisa, assim como o termo de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas, FMRP-USP e posteriormente pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, processo N° 9238/2006) (ver Anexos). Todos os indivíduos selecionados para o estudo (pacientes e voluntárias saudáveis) passaram por uma entrevista para o esclarecimento dos objetivos e metodologias desta pesquisa e responderam a um questionário (ver Anexos) para obtenção de informações fundamentais para a análise dos dados obtidos. O material coletado foi armazenado em tubos rotulados de modo que a doadora não possa ser identificada, mantendo, assim, o caráter confidencial da informação.

As amostras de sangue coletadas tiveram dois destinos: análise molecular para detecção de polimorfismos estudados por PCR-RFLP, cuja amostra foi de 107 pacientes

com CM e 175 mulheres saudáveis, e análise citogenética para a detecção dos níveis de danos no DNA no Teste do MN e no Ensaio Cometa. Dessa forma, foram excluídas da análise citogenética as mulheres que faziam uso crônico de algum tipo de medicamento que pudesse interferir nos resultados obtidos. Também foram excluídas pacientes com CM que já haviam passado pelo processo de pré-quimioterapia no momento da coleta de sangue, inviabilizando assim a análise citogenética.

Seguindo estes critérios de exclusão pacientes, os grupos para análise molecular, de micronúcleos e de lesões detectadas no Ensaio Cometa ficaram constituídos da seguinte maneira (Tabela 1):

**Tabela 1.** Número de amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise citogenética e molecular.

Número de mulheres incluídas			
GRUPO	Teste do MN	Ensaio Cometa	PCR-RFLP
Mulheres saudáveis	20	20	175
Pacientes	20	20	107

### 3.2 Avaliação citogenética

Amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama e de mulheres saudáveis foram utilizadas, *in vitro*, no Teste do MN e no Ensaio Cometa.

A coleta de sangue das pacientes para a análise citogenética foi feita antes de estas receberem qualquer tipo de tratamento (quimio/radioterapia). As culturas *in vitro* dos linfócitos do sangue periférico das pacientes e das mulheres saudáveis coletadas foram tratadas com o quimioterápico Etoposido, a fim de se avaliar a sensibilidade celular adquirida frente a esse tratamento, assim como a sensibilidade celular de indivíduos saudáveis.

### 3.2.1 Etoposido

O Etoposido é um inibidor de topoisomerase II que age estabilizando o complexo formado pelo DNA e a topo II impedindo, assim, que as duas fitas de DNA clivadas se liguem novamente. Este tipo de ação da droga bloqueia a progressão da forquilha de replicação, acarretando em danos irreversíveis no DNA que resulta num efeito citotóxico para as células, afetando a proliferação celular. Além disso, a taxa de morte celular causada pelo Etoposido está associada a concentração utilizada desta droga em células cultivadas *in vitro* (Simon *et al.*, 2006).

### 3.2.2 Citocalasina B

A citocalasina B ( $C_{29}H_{37}NO_5$  – CAS: 14930-96-2, Sigma) foi diluída em dimethylsulfoxide (DMSO - CAS: 67-68-5, Sigma) a fim de se obter uma solução de uso (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) que foi mantida a 4°C no escuro e utilizada para os experimentos na concentração final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de meio de cultura.

### 3.2.3 Tratamentos realizados

Nos experimentos *in vitro*, foram constituídos 4 grupos de tratamento para cada um dos testes (Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa): (1) controle, (2) Etoposido na concentração 5  $\mu\text{M}$ , (3) Etoposido na concentração 10  $\mu\text{M}$ , (4) Etoposido na concentração 25  $\mu\text{M}$ . Todos os tratamentos foram feitos por 1 hora em meio livre de soro. Estas concentrações foram determinadas após experimento-piloto do Teste do MN e Ensaio Cometa.

### 3.2.4.a Teste do Micronúcleo

Foram feitas culturas de linfócitos do sangue periférico coletado em tubo Vacutainer® (10 mL), contendo heparina sódica. Após sedimentação espontânea obteve-se o plasma com a camada de linfócitos e, aproximadamente 1,5 mL dessa mistura foram semeadas em 5 mL de 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 bovino inativado (Gibco) e 2% de fitohemaglutinina (Gibco). As culturas foram tratadas com Etoposido, nas 3 concentrações (5 µM, 10 µM e 25 µM) na 44<sup>a</sup> hora depois da semeadura de cultura, em meio sem soro, durante 1 hora. Posteriormente, as mesmas foram lavadas e foram adicionados 5 µg/mL de cultura de citocalasina B (Sigma) e conservadas em estufa por mais 28 horas.

A obtenção de células binucleadas seguiu a metodologia proposta por Fenech e Morley (1985), com pequenas modificações devido ao tratamento realizado, explicado a seguir. Ao final de 28 horas em contato com a citocalasina B, as culturas foram centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento (suspensão celular) foi cuidadosamente ressuspenso em 3 mL de solução hipotônica de citrato de sódio (1%) a 4°C, que foi adicionado vagarosamente pela parede do tubo. Centrifugou-se, descartou-se o sobrenadante e a suspensão celular novamente ressuspenso em 3 mL de fixador metanol/ácido acético (3:1) a 4°C e 0,5 mL de formaldeído (37%). O material foi centrifugado a 1000 r.p.m. por 5 minutos e ressuspenso em 5 mL de fixador a 4°C por mais duas vezes, sendo que na última etapa as células foram ressuspendidas em 0,5 mL 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,06 M, 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.

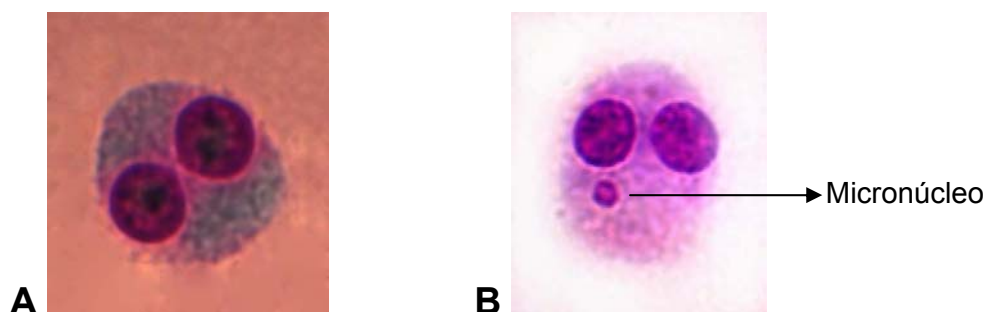
A análise foi feita em microscópio de luz de transmissão Zeiss (Germany), com aumento de 1000 vezes, sendo analisadas 1000 células binucleadas por indivíduo por tratamento, todas elas com citoplasma íntegro e núcleos principais nitidamente delimitados. Foram considerados como micronúcleos as formações com tamanho entre 1/16 e 1/3 dos núcleos principais, com coloração semelhante à coloração 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 foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989) utilizando a fórmula:

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

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

N: número total de células viáveis.



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

### 3.2.4.b Análise estatística

Os resultados obtidos no Teste do MN e no Índice de Divisão Nuclear foram analisados utilizando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey, e as razões de probabilidade foram calculadas com intervalos de confiança de 95%. As análises foram realizadas pelo software SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific).

### 3.2.5.a Ensaio Cometa

Foi utilizada a versão alcalina do Ensaio Cometa. Este teste foi iniciado após 24 horas de cultivo, sendo retiradas três alíquotas, em três tempos diferentes:  $T_0$  (imediatamente antes do início do tratamento das culturas),  $T_1$  (imediatamente após o tratamento das culturas) e  $T_2$  (quatro horas após o término do tratamento das culturas). O processamento das amostras foi feito de acordo com o protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) com algumas adaptações feitas no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que consistiu em transferir 300  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de cada cultura para um microtubo de 1,5 mL e, em seguida, o material foi centrifugado em microcentrifuga a 4°C e 500 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendido o "pellet" com auxílio de micropipeta. A este "pellet" foi acrescentado 100  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) a 0,5% e delicadamente o material foi misturado.

O homogenado foi pingado em uma lâmina recém preparada com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%), a qual foi coberta com uma lamínula e deixada a 4°C por 5 minutos. A lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em uma solução de lise (NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) à 4°C, por pelo menos duas horas. As lâminas foram então incubadas em um tampão de pH alcalino (NaOH 0,3 M e Na<sub>2</sub>EDTA 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 (1V/cm) e 300 mA.

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 em etanol absoluto por 3 minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata e armazenadas em geladeira até o momento da análise.

A análise foi feita em microscópio de fluorescência (ZEISS, filtro 516-560 nm e barreira de filtro de 590 nm), em aumento de 40X. Foram analisadas 100 células por tratamento por indivíduo, sendo observadas as células com contorno circular (núcleos sem danos de DNA) ou com forma de "cometa" (núcleos com danos no DNA), no qual a extensão da cauda reflete a distância de migração do DNA danificado.

De acordo com Speit (1995), as células são classificadas conforme o comprimento da cauda em cinco categorias que correspondem às seguintes quantidades de danos no DNA (Figura 5):

- 0 = sem danos (< 5%)
- 1 = baixo nível de danos (5-20%)
- 2 = médio nível de danos (20-40%)
- 3 = alto nível de danos (40-95%)
- 4 = totalmente danificado (> 95%)

Para análise dos danos no DNA, foi calculado o escore de danos para cada tipo de tratamento de cada indivíduo. O escore foi calculado da seguinte maneira:

Número de células classe 0 x 0

Número de células classe 1 x 1

Número de células classe 2 x 2

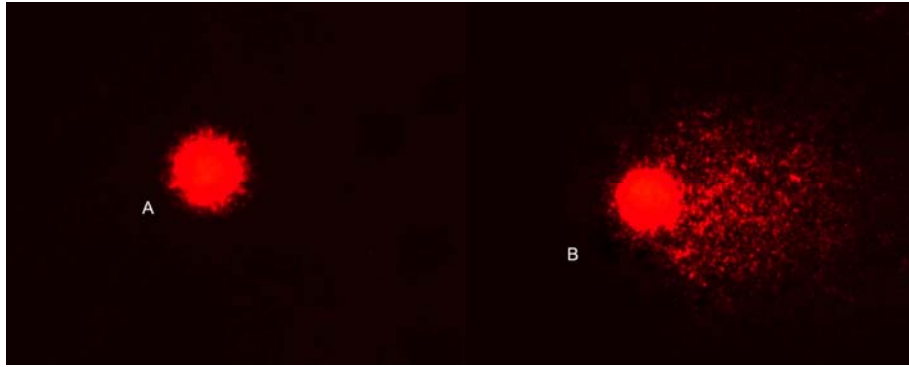
Número de células classe 3 x 3

Número de células classe 4 x 4

Em que:

Escore de Dano =  $\Sigma$  valores de cada classe/ n° de células analisadas





**Figura 5.** Nucleóide íntegro (A) e em forma de cometa (B) obtido pelo Ensaio Cometa em linfócitos de sangue periférico de paciente com câncer de mama.

### 3.2.5.b Análise estatística

Os resultados obtidos no Ensaio Cometa foram analisados utilizando-se o teste *t* de Student e Análise de Variância (ANOVA) e as razões de probabilidade foram calculadas com intervalos de confiança de 95%. As análises foram realizadas pelo software SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific). A consultoria para a análise estatística foi gentilmente prestada pelo Prof. Dr. Alexandre Souto Martinez, do Departamento de Física da FFCLRP-USP.

## 3.3 Análise molecular

### 3.3.1 Extração e quantificação de DNA genômico

A extração do DNA foi feita a partir de amostras sangue periférico, utilizando o kit de extração *WIZARD*® (Genomic DNA Purification) da Promega (Madison, WI), conforme especificações do protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria no aparelho GENEQuant (G.E.), por absorvância ultravioleta. Todo o DNA para uso foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  numa concentração de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

### 3.3.2 Amplificação das seqüências de DNA por PCR

Os polimorfismos gênicos foram analisados a partir de DNA genômico pela técnica de PCR – RFLP. Os fragmentos de interesse dos genes *XRCC1* e *XRCC3* foram amplificados em termociclador, em microtubos de 0,5 mL contendo um volume final de reação de 25 µL. A reação de amplificação dos fragmentos destes genes seguiu as condições propostas por Hu *et al.*, 2001, conforme descrito nas Tabelas 2 e 3.

Para verificar o sucesso da amplificação dos fragmentos de interesse, uma alíquota de 5 µL do produto de reação de amplificação foi misturada a 5 µL de carregador (glicerol/azul de bromofenol) e aplicada em um gel de agarose 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 observado. A observação do fragmento foi feita em um transluminador ultravioleta comparando-se o tamanho do fragmento de interesse com um marcador de DNA de 50 pb (Invitrogen).

**Tabela 2.** Seqüências iniciadoras e condições de reação para amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *XRCC1* e *XRCC3*.

Genes	Iniciadores	Composição da reação (25 µL)
<b><i>XRCC1</i></b> <b>(402 pb)</b>	F: 5' TCTCCCTTGGTCTCCAACCT 3' R: 5' AGTAGTCTGCTGGCTCTGG 3'	Tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 1,75 mM de MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen); 0,125 µM de cada iniciador (Invitrogen); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1 µL de DNA genômico (100 ng/µL), água ultra-pura estéril q.s.p.
<b><i>XRCC3</i></b> <b>(455 pb)</b>	F: 5' GGTCGAGTGACAGTCCAAAC 3' R: 5' TGCAACGGCTGAGGGTCTT 3'	Tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen); 0,15 µM de cada iniciador (Invitrogen); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1 µL de DNA genômico (100 ng/µL), água ultra-pura estéril q.s.p.

**Tabela 3.** Condições de temperatura e tempo para amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *XRCC1* e *XRCC3*.

Genes	Temperatura, tempo de número de ciclos
<b><i>XRCC1</i></b>	95°C /5 min; 35 ciclos (94°C /1 min, 59°C /1 min, 72°C /2 min); 72°C /5 min
<b><i>XRCC3</i></b>	95°C /5 min; 35 ciclos (94°C /1 min, 60°C /1 min, 72°C /1 min e 30 seg); 72°C /5 min

### 3.3.3 Detecção dos polimorfismos por PCR-RFLP

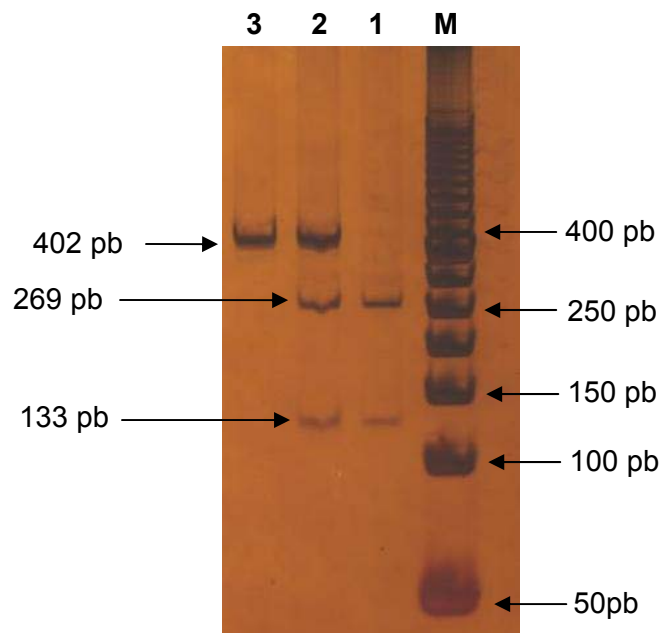
O produto da reação de amplificação de cada um dos genes de estudo foi submetido a uma digestão por enzima de restrição durante pelo menos 12 horas a 37°C segundo as condições a seguir:

***XRCC1***: 7 µL do produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEBuffer 2, New England BioLabs), 5 U da enzima *MspI* (New England BioLabs), água estéril q.s.p.; volume final de 25 µL.

***XRCC3***: 15 µL do produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEBuffer 4, New England BioLabs), BSA (10 µg/µL), 5 U da enzima *NlaIII* (New England BioLabs), água estéril q.s.p.; volume final de 20 µL.

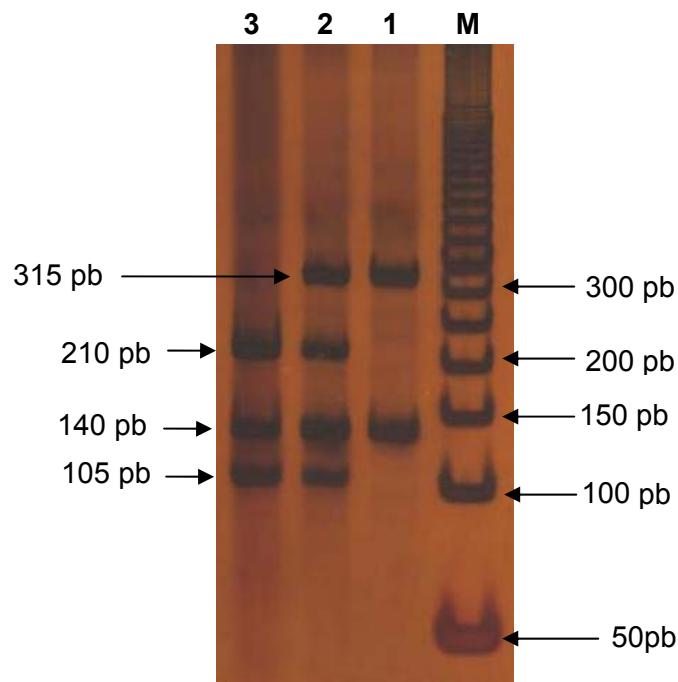
A observação dos fragmentos dos genes *XRCC* e *XRCC3* digeridos com as enzimas *MspI* e *NlaIII*, respectivamente, foi feita após uma eletroforese de pelo menos 4 horas a 120V em gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata.

Para o gene *XRCC1*, a substituição de G → A no éxon 10, códon 399, é responsável pela perda do sítio de reconhecimento da enzima *MspI*, que não cliva o fragmento de 402 pb (Figura 6).



**Figura 6.** PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *XRCC1* G → A no códon 399 detectado pela enzima *MspI*, onde M = marcador de peso molecular (50 pb). Coluna 1: homocigoto para o alelo mais freqüente (*Arg/Arg*). Coluna 2: heterocigoto (*Arg/Gln*). Coluna 3: homocigoto para o alelo menos freqüente (*Gln/Gln*).

Já a substituição C → T no éxon 7, códon 241 do gene *XRCC3*, cria um segundo sítio de restrição reconhecido pela enzima *NlaIII*, que cliva o fragmento de 455 pb em 3 fragmentos de 210, 140 e 105 pb (Figura 7).



**Figura 7.** PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *XRCC3* C → T no códon 241 detectado pela enzima *NlaIII*, onde M = marcador de peso molecular (50 pb). Coluna 1: homocigoto para o alelo mais freqüente (*Thr/Thr*). Coluna 2: heterocigoto (*Thr/Met*). Coluna 3: homocigoto para o alelo menos freqüente (*Met/Met*).

### 3.3.4 Análise estatística

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. As razões de probabilidade (*OR: odds ratio*) e o intervalo de confiança (IC) de 95% (Kleinbaum *et al.*, 1982) foram calculadas 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).



## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Caracterização geral da amostra de pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis estudadas**

A Tabela 4 apresenta os dados referentes à caracterização da amostra estudada na análise molecular quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca, presença ou ausência da menopausa, uso de hormônios como contraceptivo oral ou terapia de reposição hormonal, idade da primeira gestação e parentesco com pessoas com câncer.

Observou-se uma frequência maior de mulheres acima de 45 anos no grupo de pacientes (61,6%). Ainda na Tabela 4, observou-se que 69,2% das pacientes não fizeram uso de contraceptivo oral e que 62,6% das mulheres saudáveis ainda não estavam na menopausa. Não foi verificada diferença significativa quando se comparou os dois grupos de estudo quanto aos parâmetros idade, hábito tabagista, idade da menarca, terapia de reposição hormonal, idade da primeira gestação e parentesco com pessoas com câncer, o que confirma a uniformidade da amostra em questão.

A Tabela 5 apresenta os dados referentes à caracterização da amostra utilizada somente na análise citogenética quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca, presença ou ausência da menopausa, uso de hormônios como contraceptivo oral ou terapia de reposição hormonal, idade da primeira gestação e parentesco com pessoas com câncer.

A média de idade das pacientes da amostra de citogenética foi de 49,9 anos, enquanto entre as mulheres saudáveis, essa média foi de 46,9 anos, mas essa pequena diferença em nada afetou a nossa amostra uma vez que não foi observada diferença significativa entre pacientes com CM e as mulheres saudáveis quando comparados os parâmetros citados.

**Tabela 4.** Caracterização geral da amostra de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise citogenética e molecular quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca, presença ou ausência da menopausa, uso de hormônios como contraceptivo oral ou terapia de reposição hormonal, idade da primeira gestação e parentesco com pessoas com câncer.

Fator	Pacientes (n = 107)		Mulheres saudáveis (n = 175)		Valor de P
	N	%	N	%	
<b>Idade</b>					
≤ 45 anos	41	38,4	87	49,7	0,06
> 45 anos	66	61,6	88	50,3	
<b>Tabagismo</b>					
Não-Fumantes	84	78,5	135	77,1	0,90
Fumantes	23	21,5	40	22,9	
<b>Menarca</b>					
≤ 13 anos	65	61,3	113	64,6	0,67
> 13 anos	41	38,7	62	35,4	
NI	1	-	-	-	
<b>Menopausa</b>					
ausente	51	47,7	109	62,6	0,01*
presente	56	52,3	65	37,4	
NI	-	-	1	-	
<b>Uso de Hormônios</b>					
Contraceptivo oral					
Sim	33	30,8	76	43,4	0,04*
Não	74	69,2	99	56,6	
Terapia de reposição hormonal					
Sim	15	14,0	27	15,4	0,88
Não	92	86,0	148	84,6	
<b>Idade da primeira gestação</b>					
≤ 30 anos	82	76,6	136	77,7	0,32
> 30 anos	11	10,3	4	2,3	
Nuligesta	14	13,1	35	20,0	
<b>Familiares com câncer</b>					
Sim	59	55,1	88	50,3	0,50
Não	48	44,9	87	49,7	

Teste Qui-Quadrado com  $\alpha = 0,05$ ; NI: não informado

\* Estatisticamente significativo



**Tabela 5.** Caracterização geral da amostra de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise citogenética quanto à idade, ao hábito tabagista, à idade da menarca, a presença ou ausência da menopausa, ao uso de hormônios como contraceptivo oral ou terapia de reposição hormonal, a idade da primeira gestação e ao parentesco com pessoas com câncer.

Fator	Pacientes (n = 20)		Mulheres saudáveis (n = 20)		Valor de P
	N	%	N	%	
<b>Idade</b>					
≤ 45 anos	4	20,0	9	45,0	0,17
> 45 anos	16	80,0	11	55,0	
<b>Tabagismo</b>					
Não-Fumantes	17	85,0	16	80,0	0,67
Fumantes	3	15,0	4	20,0	
<b>Menarca</b>					
≤ 13 anos	14	73,7	15	75,0	0,92
> 13 anos	5	26,3	5	25,0	
NI	1	-	-	-	
<b>Menopausa</b>					
ausente	9	45,0	11	57,9	0,62
presente	11	55,0	8	42,1	
NI	-	-	1	-	
<b>Uso de Hormônios</b>					
Contraceptivo oral					
Sim	2	10,0	3	15,0	0,63
Não	18	90,0	17	85,0	
Terapia de reposição					
Sim	3	15,0	4	20,0	0,67
Não	17	85,0	16	80,0	
<b>Idade da primeira</b>					
≤ 30 anos	15	75,0	16	80,0	0,99
> 30 anos	3	15,0	-	-	
Nuligesta	2	10,0	4	20,0	
<b>Familiares com câncer</b>					
Sim	11	55,0	13	65,0	0,74
Não	9	45,0	7	35,0	

Teste Qui-Quadrado com  $\alpha = 0,05$ ; NI: não informado

## **4.2 Análise da extensão dos níveis de danos basais e induzidos de lesões no DNA detectadas pelo Índice de Divisão Nuclear (IDN), Teste do Micronúcleo (MN) e Ensaio Cometa**

No Teste do MN, foi realizada uma análise de IDN onde não foi observada diferença significativa entre os diferentes tipos de tratamentos (controle e Etoposido 5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ ) dentro dos grupos de pacientes e mulheres saudáveis, assim como na comparação entre estes dois grupos (Tabela 6).

Quanto ao Teste do MN, foi observada, dentro do grupo de pacientes, uma diferença significativa na frequência de MN entre a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de Etoposido e o tratamento controle ( $P < 0,05$ ). Quando comparado o grupo de pacientes e mulheres saudáveis, houve diferença significativa ( $P = 0,007$ ) na indução de MNs somente na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , embora haja uma tendência de aumento no grupo de pacientes em relação ao grupo de mulheres saudáveis nas outras concentrações utilizadas (Tabela 7).

Foi feita uma fragmentação das faixas etárias considerando-se intervalos de 15 anos para ver se há relação desta com a frequência de MN (Tabela 8). Nessa análise foi considerada apenas a média de MNs obtida em pacientes e mulheres saudáveis nos tratamentos (controle e Etoposido 5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ ). Dentro do grupo de pacientes, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à frequência média de MN entre a cultura controle e os diferentes tratamentos com Etoposido (5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ ). O mesmo foi verificado dentro do grupo de mulheres saudáveis. Quando se comparou o grupo de pacientes e mulheres saudáveis entre si na faixa etária acima dos 40 anos, verificou-se uma sensibilidade maior das pacientes em relação às mulheres saudáveis nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$ , embora não estatisticamente significativo.

Quanto ao hábito tabagista, quando comparada à frequência média de MN entre pacientes com CM e mulheres saudáveis, não se observou diferença significativa entre os grupos de pacientes e mulheres saudáveis fumantes e não fumantes (Tabela 9).

No Ensaio Cometa foi verificada diferença significativa entre o tratamento controle e os tratamentos com Etoposido (5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ ) somente em  $T_1$  para ambos os grupos estudados (pacientes e mulheres saudáveis) (Tabela 10).

Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes e mulheres saudáveis quando estes dois grupos foram comparados entre si nos mesmos tempos ( $T_0$  vs.  $T_0$ ;  $T_1$  vs.  $T_1$ ;  $T_2$  vs.  $T_2$ ) durante o Ensaio Cometa (Tabela 10).

Quando feita a comparação dentro do grupo de mulheres saudáveis e dentro do grupo de pacientes com CM, não foi observada diferença significativa do tratamento controle no tempo  $T_0$  em relação a  $T_1$  e  $T_2$ , assim como quando comparado entre  $T_1$  e  $T_2$ . Nos tratamentos de Etoposido (5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ ), foi verificada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tempos  $T_0$  e  $T_1$  e entre  $T_1$  e  $T_2$  nos dois grupos estudados. Quando comparado  $T_0$  com  $T_2$ , não houve diferença significativa entre estes tempos para todos os tipos de tratamentos realizados (Tabela 10).

A Tabela 11 mostra os dados obtidos pelo Ensaio Cometa em pacientes com CM e mulheres saudáveis de acordo com a idade ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos) no tempo  $T_0$ . Não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos estudados e para os diferentes tratamentos. Quando se comparou o grupo de pacientes com o grupo de mulheres saudáveis no tempo  $T_1$ , foi encontrada diferença significativa apenas para o tratamento com Etoposido 25  $\mu\text{M}$ , na comparação feita entre pacientes ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos) e entre pacientes e mulheres saudáveis com idade  $\leq 45$  anos (Tabela 12). Em todas as comparações feitas em  $T_2$  com relação à idade, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos e os diferentes tratamentos (Tabela 13).

Quanto ao hábito tabagista, no Ensaio Cometa, não foi verificada diferença significativa quando se comparou o grupo de pacientes e mulheres saudáveis nos diferentes tratamentos no tempo  $T_0$  (Tabela 14). Ainda quanto ao hábito tabagista, foi verificada diferença significativa apenas no grupo de mulheres saudáveis em  $T_1$  para os tratamentos com Etoposido 10 e 25  $\mu\text{M}$  (Tabela 15). Em  $T_2$ , ainda no grupo de mulheres saudáveis, observou-se diferença significativa apenas para o tratamento controle (Tabela 16).

**Tabela 6.** Médias dos Índices de Divisão Nuclear (IDN) observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Tratamentos	IDN (X ± DP)		
	Mulheres saudáveis	Pacientes	P
Controle	1,78 ± 0,30	1,62 ± 0,21	0,65
Etoposido - 5 µM	1,76 ± 0,34	1,58 ± 0,17	0,49
Etoposido - 10 µM	1,73 ± 0,29	1,58 ± 0,19	0,37
Etoposido - 25 µM	1,71 ± 0,30	1,54 ± 0,21	0,65
P	> 0,05	> 0,05	

P: Teste de Tukey com  $\alpha = 0,05$  (comparação entre pacientes e mulheres saudáveis)

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

**Tabela 7.** Frequência média de micronúcleos observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Tratamentos	Frequência de MN (X ± DP)			
	Mulheres saudáveis	P	Pacientes	P
Controle	8,7 ± 5,83	-	10,9 ± 9,87	-
Etoposido - 5 µM	12,0 ± 7,29	-	14,2 ± 9,70	-
Etoposido - 10 µM	12,7 ± 9,40	-	16,5 ± 8,56	-
Etoposido - 25 µM	12,9 ± 8,1	-	19,1 ± 7,35*.#	< 0,05

P: Teste de Tukey com  $\alpha = 0,05$  (comparação entre pacientes e mulheres saudáveis)

\* Estatisticamente diferente do tratamento controle dentro do mesmo grupo

# Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em relação ao grupo de mulheres saudáveis

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

**Tabela 8.** Frequência média de micronúcleos observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, considerando diferentes faixas etárias. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

Frequência de MN ( $X \pm DP$ )								
Tratamentos	Pacientes (n = 20)				Mulheres saudáveis (n = 20)			
	Faixa Etária			P	Faixa Etária			P
	25-40 anos (n = 1)	41-55 anos (n = 15)	$\geq 56$ anos (n = 4)		25-40 anos (n = 4)	41-55 anos (n = 12)	$\geq 56$ anos (n = 3)	
Controle	3,00 <sup>^</sup>	12,33 $\pm$ 10,93	7,50 $\pm$ 3,70	0,36	4,25 $\pm$ 2,63	8,83 $\pm$ 6,00	12,00 $\pm$ 6,24	0,12
Etoposido 5 $\mu$ M	3,00 <sup>^</sup>	13,47 $\pm$ 10,15	19,50 $\pm$ 5,74	0,20	6,25 $\pm$ 2,63	13,08 $\pm$ 6,88	11,67 $\pm$ 10,02	0,26
Etoposido 10 $\mu$ M	5,00 <sup>^</sup>	17,73 $\pm$ 8,84	14,50 $\pm$ 6,45	0,95	9,25 $\pm$ 3,30	11,50 $\pm$ 9,57	18,00 $\pm$ 13,00	0,40
Etoposido 25 $\mu$ M	3,00 <sup>^</sup>	19,87 $\pm$ 7,22	20,00 $\pm$ 2,94	0,56	9,75 $\pm$ 9,43	13,17 $\pm$ 7,58	11,67 $\pm$ 8,08	0,54

P: Teste de Tukey com  $\alpha = 0,05$  (comparação entre pacientes e mulheres saudáveis)

X  $\pm$  DP: Média  $\pm$  Desvio Padrão

<sup>^</sup> Dado não utilizado na análise estatística devido a um número insuficiente de indivíduos neste grupo

**Tabela 9.** Frequência média de micronúcleos observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, considerando hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células binucleadas/indivíduo.

Frequência de MN ( $X \pm DP$ )			
Tratamentos	Pacientes (n = 20)		
	Fumantes (n = 3)	Não-Fumantes (n = 17)	P
Controle	4,67 $\pm$ 1,15	12,00 $\pm$ 10,34	0,27
Etoposido - 5 $\mu$ M	2,33 $\pm$ 2,31	16,24 $\pm$ 8,96	0,08
Etoposido - 10 $\mu$ M	12,00 $\pm$ 1,73	17,24 $\pm$ 9,07	0,90
Etoposido - 25 $\mu$ M	16,33 $\pm$ 4,62	19,53 $\pm$ 7,74	0,62
Tratamentos	Mulheres saudáveis (n = 20)		
	Fumantes (n = 4)	Não-Fumantes (n = 16)	P
Controle	9,50 $\pm$ 7,14	12,44 $\pm$ 10,52	0,78
Etoposido - 5 $\mu$ M	10,25 $\pm$ 8,66	16,00 $\pm$ 9,20	0,27
Etoposido - 10 $\mu$ M	14,25 $\pm$ 13,00	17,19 $\pm$ 9,36	0,60
Etoposido - 25 $\mu$ M	10,75 $\pm$ 6,85	19,56 $\pm$ 7,99	0,10
Tratamentos	Pacientes	vs.	Mulheres saudáveis
	Fumantes (n = 3)		Fumantes (n = 3)
Controle	4,67 $\pm$ 1,15		9,50 $\pm$ 7,14
Etoposido - 5 $\mu$ M	2,33 $\pm$ 2,31		10,25 $\pm$ 8,66
Etoposido - 10 $\mu$ M	12,00 $\pm$ 1,73		14,25 $\pm$ 13,00
Etoposido - 25 $\mu$ M	16,33 $\pm$ 4,62		10,75 $\pm$ 6,85
Tratamentos	Pacientes	vs.	Mulheres saudáveis
	Não-Fumantes (n = 17)		Não-Fumantes (n = 16)
Controle	12,00 $\pm$ 10,34		12,44 $\pm$ 10,52
Etoposido - 5 $\mu$ M	16,24 $\pm$ 8,96		16,00 $\pm$ 9,20
Etoposido - 10 $\mu$ M	17,24 $\pm$ 9,07		17,19 $\pm$ 9,36
Etoposido - 25 $\mu$ M	19,53 $\pm$ 7,74		19,56 $\pm$ 7,99

P: Teste de Tukey com  $\alpha = 0,05$   
 $X \pm DP$ : Média  $\pm$  Desvio Padrão

**Tabela 10.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura no Ensaio Cometa, submetidos a diferentes tratamentos, *in vitro*, com Etoposido e seu respectivo controle. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo em cada tempo ( $T_0$ ,  $T_1$  e  $T_2$ ) do experimento.

Escore de Dano no DNA						
Tratamentos	Mulheres saudáveis ( $X \pm DP$ )			Pacientes ( $X \pm DP$ )		
	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_0$	$T_1$	$T_2$
<b>Controle</b>	0,28 $\pm$ 0,29	0,20 $\pm$ 0,16	0,19 $\pm$ 0,64	0,24 $\pm$ 0,15	0,27 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,08
<b>Etoposido - 5 <math>\mu</math>M</b>	0,21 $\pm$ 0,35	0,52 $\pm$ 0,26*	0,24 $\pm$ 0,23	0,20 $\pm$ 0,14	0,45 $\pm$ 0,21*	0,22 $\pm$ 0,12
<b>Etoposido - 10 <math>\mu</math>M</b>	0,54 $\pm$ 0,34	0,54 $\pm$ 0,35*	0,24 $\pm$ 0,21	0,20 $\pm$ 0,13	0,61 $\pm$ 0,26*	0,28 $\pm$ 0,16
<b>Etoposido - 25 <math>\mu</math>M</b>	0,24 $\pm$ 0,29	0,56 $\pm$ 0,25*	0,22 $\pm$ 0,30	0,23 $\pm$ 0,14	0,62 $\pm$ 0,14*	0,23 $\pm$ 0,14

P: Teste de Tukey com  $\alpha = 0,05$  (comparação entre pacientes e mulheres saudáveis)

\* Estatisticamente diferente do tratamento controle dentro do mesmo grupo (pacientes ou mulheres saudáveis) e em relação aos tempo  $T_0$  e  $T_2$

$X \pm DP$ : Média  $\pm$  Desvio Padrão

**Tabela 11.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação a idade ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos). Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Escore de Dano no DNA em T <sub>0</sub> (X $\pm$ DP)			
Tratamentos	Pacientes em T <sub>0</sub> (n = 20)		P
	$\leq 45$ anos (n = 4)	$> 45$ anos (n = 16)	
Controle	0,12 $\pm$ 0,13	0,27 $\pm$ 0,15	0,30
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,15 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,15	0,81
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,12 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,14	0,17
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,08 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,14	0,15
Tratamentos	Mulheres saudáveis em T <sub>0</sub> (n = 20)		P
	$\leq 45$ anos (n = 9)	$> 45$ anos (n = 11)	
Controle	0,30 $\pm$ 0,24	0,27 $\pm$ 0,34	0,88
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,18 $\pm$ 0,18	0,24 $\pm$ 0,44	0,70
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,23 $\pm$ 0,23	0,31 $\pm$ 0,42	0,67
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,20 $\pm$ 0,13	0,27 $\pm$ 0,37	0,61
Tratamentos	Pacientes em T <sub>0</sub>	vs. Mulheres saudáveis em T <sub>0</sub>	P
	$\leq 45$ anos (n = 4)	$\leq 45$ anos (n = 9)	
Controle	0,12 $\pm$ 0,13	0,30 $\pm$ 0,24	0,10
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,15 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,18	0,56
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,12 $\pm$ 0,09	0,23 $\pm$ 0,23	0,30
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,08 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,13	0,05
Tratamentos	Pacientes em T <sub>0</sub>	vs. Mulheres saudáveis em T <sub>0</sub>	P
	$> 45$ anos (n = 16)	$> 45$ anos (n = 11)	
Controle	0,27 $\pm$ 0,15	0,27 $\pm$ 0,34	0,76
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,21 $\pm$ 0,15	0,24 $\pm$ 0,44	0,72
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,22 $\pm$ 0,14	0,31 $\pm$ 0,42	0,37
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,26 $\pm$ 0,14	0,27 $\pm$ 0,37	0,58

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

X  $\pm$  DP: Média  $\pm$  Desvio Padrão



**Tabela 12.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação a idade ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos). Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Escore de Dano no DNA em T <sub>1</sub> (X $\pm$ DP)			
Tratamentos	Pacientes em T <sub>1</sub> (n = 20)		P
	$\leq 45$ anos (n = 4)	$> 45$ anos (n = 16)	
Controle	0,13 $\pm$ 0,09	0,31 $\pm$ 0,15	0,24
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,35 $\pm$ 0,21	0,48 $\pm$ 0,22	0,061
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,47 $\pm$ 0,16	0,63 $\pm$ 0,28	0,13
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,42 $\pm$ 0,17	0,67 $\pm$ 0,36	0,03*
Tratamentos	Mulheres saudáveis em T <sub>1</sub> (n = 20)		P
	$\leq 45$ anos (n = 9)	$> 45$ anos (n = 11)	
Controle	0,22 $\pm$ 0,16	0,18 $\pm$ 0,17	0,94
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,51 $\pm$ 0,16	0,54 $\pm$ 0,32	0,34
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,55 $\pm$ 0,20	0,55 $\pm$ 0,45	0,60
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,59 $\pm$ 0,13	0,54 $\pm$ 0,31	0,52
Tratamentos	Pacientes em T <sub>1</sub>	vs. Mulheres saudáveis em T <sub>1</sub>	P
	$\leq 45$ anos (n = 4)	$\leq 45$ anos (n = 9)	
Controle	0,13 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,16	0,36
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,35 $\pm$ 0,21	0,51 $\pm$ 0,16	0,21
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,47 $\pm$ 0,16	0,55 $\pm$ 0,20	0,70
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,42 $\pm$ 0,17	0,59 $\pm$ 0,13	0,03*
Tratamentos	Pacientes em T <sub>1</sub>	vs. Mulheres saudáveis em T <sub>1</sub>	P
	$> 45$ anos (n = 16)	$> 45$ anos (n = 11)	
Controle	0,31 $\pm$ 0,15	0,18 $\pm$ 0,17	0,19
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,48 $\pm$ 0,22	0,54 $\pm$ 0,32	0,66
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,63 $\pm$ 0,28	0,55 $\pm$ 0,45	0,30
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,67 $\pm$ 0,36	0,54 $\pm$ 0,31	0,12

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

X  $\pm$  DP: Média  $\pm$  Desvio Padrão

\* Estatisticamente significativo

**Tabela 13.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação a idade ( $\leq 45$  anos e  $> 45$  anos). Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Escore de Dano no DNA em T <sub>2</sub> (X $\pm$ DP)			
Tratamentos	Pacientes em T <sub>2</sub> (n = 20)		P
	$\leq 45$ anos (n = 4)	$> 45$ anos (n = 16)	
Controle	0,25 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,08	0,58
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,16 $\pm$ 0,09	0,24 $\pm$ 0,13	0,17
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,16	0,13
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,14	0,27
Tratamentos	Mulheres saudáveis em T <sub>2</sub> (n = 20)		P
	$\leq 45$ anos (n = 9)	$> 45$ anos (n = 11)	
Controle	0,14 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,35	0,47
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,21 $\pm$ 0,09	0,31 $\pm$ 0,30	0,30
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,29 $\pm$ 0,29	0,28 $\pm$ 0,29	0,96
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,21 $\pm$ 0,09	0,26 $\pm$ 0,41	0,63
Tratamentos	Pacientes em T <sub>2</sub>	vs. Mulheres saudáveis em T <sub>2</sub>	P
	$\leq 45$ anos (n = 4)	$\leq 45$ anos (n = 9)	
Controle	0,25 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,08	0,17
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,16 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,09	0,54
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,29	0,59
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,09	0,45
Tratamentos	Pacientes em T <sub>2</sub>	vs. Mulheres saudáveis em T <sub>2</sub>	P
	$> 45$ anos (n = 16)	$> 45$ anos (n = 11)	
Controle	0,22 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,35	0,72
Etoposido - 5 $\mu$ M	0,24 $\pm$ 0,13	0,31 $\pm$ 0,30	0,28
Etoposido - 10 $\mu$ M	0,31 $\pm$ 0,16	0,28 $\pm$ 0,29	0,72
Etoposido - 25 $\mu$ M	0,25 $\pm$ 0,14	0,26 $\pm$ 0,41	0,75

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

X  $\pm$  DP: Média  $\pm$  Desvio Padrão

**Tabela 14.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação ao hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Escore de Dano no DNA em T <sub>0</sub> (X ± DP)			
Tratamentos	Pacientes em T <sub>0</sub> (n = 20)		
	Fumantes (n = 3)	Não-Fumantes (n = 17)	P
Controle	0,18 ± 0,03	0,25 ± 0,17	0,62
Etoposido - 5 µM	0,12 ± 0,03	0,22 ± 0,14	0,75
Etoposido - 10 µM	0,18 ± 0,12	0,20 ± 0,14	0,85
Etoposido - 25 µM	0,14 ± 0,06	0,24 ± 0,15	0,29
Tratamentos	Mulheres saudáveis em T <sub>0</sub> (n = 20)		
	Fumantes (n = 4)	Não-Fumantes (n = 16)	P
Controle	0,11 ± 0,12	0,33 ± 0,31	0,21
Etoposido - 5 µM	0,08 ± 0,07	0,25 ± 0,38	0,08
Etoposido - 10 µM	0,15 ± 0,08	0,31 ± 0,38	0,24
Etoposido - 25 µM	0,14 ± 0,17	0,25 ± 0,31	0,72
Tratamentos	Pacientes em T <sub>0</sub>	vs.	Mulheres saudáveis em T <sub>0</sub>
	Fumantes (n = 3)		Fumantes (n = 3)
Controle	0,18 ± 0,03		0,11 ± 0,12
Etoposido - 5 µM	0,12 ± 0,03		0,08 ± 0,07
Etoposido - 10 µM	0,18 ± 0,12		0,15 ± 0,08
Etoposido - 25 µM	0,14 ± 0,06		0,14 ± 0,17
Tratamentos	Pacientes em T <sub>0</sub>	vs.	Mulheres saudáveis em T <sub>0</sub>
	Não-Fumantes (n = 17)		Não-Fumantes (n = 16)
Controle	0,25 ± 0,17		0,33 ± 0,31
Etoposido - 5 µM	0,22 ± 0,14		0,25 ± 0,38
Etoposido - 10 µM	0,20 ± 0,14		0,31 ± 0,38
Etoposido - 25 µM	0,24 ± 0,15		0,25 ± 0,31

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

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

**Tabela 15.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação ao hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Escore de Dano no DNA em T <sub>1</sub> (X ± DP)				
Tratamentos	Pacientes em T <sub>1</sub> (n = 20)			P
	Fumantes (n = 3)	Não-Fumantes (n = 17)		
Controle	0,35 ± 0,21	0,26 ± 0,15		0,96
Etoposido - 5 µM	0,34 ± 0,23	0,48 ± 0,22		0,27
Etoposido - 10 µM	0,35 ± 0,21	0,65 ± 0,25		0,13
Etoposido - 25 µM	0,48 ± 0,32	0,65 ± 0,35		0,12
Tratamentos	Mulheres saudáveis em T <sub>1</sub> (n = 20)			P
	Fumantes (n = 4)	Não-Fumantes (n = 16)		
Controle	0,17 ± 0,07	0,22 ± 0,18		0,64
Etoposido - 5 µM	0,43 ± 0,08	0,55 ± 0,28		0,26
Etoposido - 10 µM	0,38 ± 0,19	0,59 ± 0,38		0,006*
Etoposido - 25 µM	0,44 ± 0,22	0,59 ± 0,24		0,003*
Tratamentos	Pacientes em T <sub>1</sub>	vs.	Mulheres saudáveis em T <sub>1</sub>	P
	Fumantes (n = 3)		Fumantes (n = 4)	
Controle	0,35 ± 0,21		0,17 ± 0,07	0,53
Etoposido - 5 µM	0,34 ± 0,23		0,43 ± 0,08	0,51
Etoposido - 10 µM	0,35 ± 0,21		0,38 ± 0,19	0,51
Etoposido - 25 µM	0,48 ± 0,32		0,44 ± 0,22	0,46
Tratamentos	Pacientes em T <sub>1</sub>	vs.	Mulheres saudáveis em T <sub>1</sub>	P
	Não-Fumantes (n = 17)		Não-Fumantes (n = 16)	
Controle	0,26 ± 0,15		0,22 ± 0,18	0,14
Etoposido - 5 µM	0,48 ± 0,22		0,55 ± 0,28	0,77
Etoposido - 10 µM	0,65 ± 0,25		0,59 ± 0,38	0,86
Etoposido - 25 µM	0,65 ± 0,35		0,59 ± 0,24	0,94

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

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

\* Estatisticamente significativo

**Tabela 16.** Média de Escore de Dano (ED) no DNA observados em linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (20 indivíduos) e do grupo de pacientes (20 indivíduos) em cultura submetidos, *in vitro*, a diferentes tratamentos com Etoposido, e seu respectivo controle, divididos em relação ao hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.

Escore de Dano no DNA em T <sub>2</sub> (X ± DP)			
Tratamentos	Pacientes em T <sub>2</sub> (n = 20)		
	Fumantes (n = 3)	Não-Fumantes (n = 17)	P
Controle	0,24 ± 0,15	0,23 ± 0,07	0,90
Etoposido - 5 µM	0,20 ± 0,11	0,22 ± 0,13	0,58
Etoposido - 10 µM	0,22 ± 0,12	0,30 ± 0,16	0,27
Etoposido - 25 µM	0,19 ± 0,12	0,24 ± 0,14	0,54
Tratamentos	Mulheres saudáveis em T <sub>2</sub> (n = 20)		
	Fumantes (n = 4)	Não-Fumantes (n = 16)	P
Controle	0,08 ± 0,07	0,23 ± 0,29	0,02*
Etoposido - 5 µM	0,18 ± 0,08	0,27 ± 0,26	0,25
Etoposido - 10 µM	0,19 ± 0,05	0,26 ± 0,24	0,37
Etoposido - 25 µM	0,12 ± 0,03	0,25 ± 0,34	0,29
Tratamentos	Pacientes em T <sub>2</sub>	vs.	Mulheres saudáveis em T <sub>2</sub>
	Fumantes (n = 3)		Fumantes (n = 4)
Controle	0,24 ± 0,15		0,08 ± 0,07
Etoposido - 5 µM	0,20 ± 0,11		0,18 ± 0,08
Etoposido - 10 µM	0,22 ± 0,12		0,19 ± 0,05
Etoposido - 25 µM	0,19 ± 0,12		0,12 ± 0,03
Tratamentos	Pacientes em T <sub>2</sub>	vs.	Mulheres saudáveis em T <sub>2</sub>
	Não-Fumantes (n = 17)		Não-Fumantes (n = 16)
Controle	0,23 ± 0,07		0,23 ± 0,29
Etoposido - 5 µM	0,22 ± 0,13		0,27 ± 0,26
Etoposido - 10 µM	0,30 ± 0,16		0,26 ± 0,24
Etoposido - 25 µM	0,24 ± 0,14		0,25 ± 0,34

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

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

\* Estatisticamente significativo

### 4.3 Análise da frequência dos polimorfismos nos genes *XRCC1* e *XRCC3* na amostra utilizada na avaliação citogenética

As pessoas estudadas com relação a frequência de MN e no Ensaio Cometa foram também estudadas quanto as frequências dos polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3*. O número amostral é pequeno, mas procurou-se verificar a prevalência de algum genótipo entre pacientes e mulheres saudáveis.

Com relação aos genótipos observados na amostra estudada na análise citogenética, o genótipo *Arg/Gln*, para o gene *XRCC1*, foi o mais freqüente tanto no grupo de pacientes com CM (60,0%) quanto no grupo de mulheres saudáveis (80,0%) (Tabela 17).

Quanto ao gene *XRCC3*, observou-se que o genótipo heterozigoto (*Thr/Met*) foi mais freqüente nas pacientes (48,6%) do que nas mulheres saudáveis (32,0%). Em relação ao genótipo *Thr/Thr*, foi observada sua presença em 57,7% das mulheres saudáveis e 39,3% das pacientes (Tabela 17).

Não foram encontradas diferenças significativas entre pacientes e mulheres saudáveis com relação às frequências alélicas dos genes *XRCC1* e *XRCC3* (Tabela 18). Estas frequências observadas são semelhantes às encontradas na amostra geral utilizada na análise molecular e estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 17.** Frequência dos genótipos das amostras utilizadas no Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa em relação aos polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3*.

Locus	Genótipo	Número/Total (%)	
		Pacientes	Mulheres saudáveis
<i>XRCC1</i> Códon 399	<i>Arg/Arg</i>	7/20 (35,0)	3/20 (15,0)
	<i>Arg/Gln</i>	12/20 (60,0)	16/20 (80,0)
	<i>Gln/Gln</i>	1/20 (5,0)	1/20 (5,0)
<i>XRCC3</i> Códon 241	<i>Thr/Thr</i>	7/20 (39,3)	13/20 (57,7)
	<i>Thr/Met</i>	11/20 (48,6)	4/20 (32,0)
	<i>Met/Met</i>	2/20 (12,1)	3/20 (10,3)

**Tabela 18.** Distribuição das frequências alélicas das amostras utilizadas no Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa em relação aos polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3*.

Genes	Alelos	Pacientes (n = 20)	Mulheres saudáveis (n = 20)	OR (95% IC)	P
<i>XRCC1</i> Códon 399	<i>Arg</i>	0,65	0,55	1,30 (0,49 – 3,42)	0,63
	<i>Gln</i>	0,35	0,45		
<i>XRCC3</i> Códon 241	<i>Thr</i>	0,63	0,75	0,57 (0,18 – 1,77)	0,40
	<i>Met</i>	0,37	0,25		

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher.

#### 4.4 Distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados nos genes *XRCC1* e *XRCC3* em pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis

As distribuições das frequências genotípicas para os polimorfismos estudados nos genes *XRCC1* e *XRCC3* em pacientes (n = 107) e mulheres saudáveis (n = 175) estão apresentadas na Tabela 19.

Quando analisada a frequência do polimorfismo *Arg399Gln* para o gene *XRCC1* na amostra total de pacientes (n = 107) e mulheres saudáveis (n = 175), o genótipo homozigoto para o alelo variante (*Gln/Gln*) foi detectado em 4,7% das pacientes com CM e em 6,8% das mulheres saudáveis. Com relação ao genótipo heterozigoto (*Arg/Gln*), foi observada a sua presença em 61,7% das pacientes e 65,2% das mulheres saudáveis, enquanto o genótipo *Arg/Arg* foi observado em 33,6% das pacientes e 28,0% das mulheres saudáveis (Tabela 19).

Em relação ao polimorfismo do gene *XRCC3*, *Thr241Met*, 12,1% das pacientes com CM e 10,3% das mulheres saudáveis apresentaram o genótipo homozigoto para o alelo variante (*Met/Met*). O genótipo heterozigoto (*Thr/Met*) foi detectado em 48,6% das pacientes e em 32,0% das mulheres saudáveis, enquanto que o genótipo *Thr/Thr* esteve presente em 39,3% das pacientes com CM e 57,7% das mulheres saudáveis (Tabela 19).

Em relação ao gene *XRCC1*, em todas as diferentes associações feitas com os genótipos, não foi verificada diferença significativa entre o grupo de pacientes e o grupo de mulheres saudáveis (Tabela 19). Quando feitas as mesmas associações para o gene *XRCC3*, foi observada diferença significativa entre o genótipo heterozigoto e o genótipo *Thr/Thr* ( $P = 0,002$ ) assim como quando feita a associação dos genótipos que possuem do alelo *241Met* ( $P = 0,003$ ) (Tabela 19).

Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências alélicas de pacientes em relação às frequências alélicas de mulheres saudáveis para os genes *XRCC1* e *XRCC3* (Tabela 20). Estas frequências observadas estão dentro do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.



**Tabela 19.** Distribuição e comparação das frequências genótípicas dos genes *XRCC1* e *XRCC3* em pacientes com CM e mulheres saudáveis.

Número/Total (%)					
Locus	Genótipo	Pacientes	Mulheres saudáveis	OR (95%IC)	P
<i>XRCC1</i> Códon 399	<i>Arg/Arg</i>	36/107 (33,6)	49/175 (28,0)	1,0 (referência)	-
	<i>Arg/Gln</i>	66/107 (61,7)	114/175 (65,2)	0,78 (0,46 – 1,33)	0,41
	<i>Gln/Gln</i>	5/107 (4,7)	12/175 (6,8)	0,56 (0,18 – 1,75)	0,42
	<i>Arg/Gln + Gln/Gln</i>	71/107 (66,4)	126/175 (72,0)	0,76 (0,45 – 1,29)	0,35
<i>XRCC3</i> Códon 241	<i>Thr/Thr</i>	42/107 (39,3)	101/175 (57,7)	1,0 (referência)	-
	<i>Thr/Met</i>	52/107 (48,6)	56/175 (32,0)	2,23 (1,32 – 3,76)	0,002*
	<i>Met/Met</i>	13/107 (12,1)	18/175 (10,3)	1,74 (0,78 – 3,86)	0,20
	<i>Thr/Met + Met/Met</i>	65/107 (60,7)	74/175 (42,3)	2,11 (1,29 – 3,45)	0,003*

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher

\* Estatisticamente significativo

**Tabela 20.** Distribuição das frequências alélicas dos genes *XRCC1* e *XRCC3* nas amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis.

Genes	Alelos	Pacientes (n = 107)	Mulheres saudáveis (n = 175)	OR (95% IC)	P
<i>XRCC1</i> Códon 399	<i>Arg</i>	0,65	0,60	0,90 (0,61 - 1,32)	0,62
	<i>Gln</i>	0,35	0,40		
<i>XRCC3</i> Códon 241	<i>Thr</i>	0,63	0,74	1,47 (0,97 - 2,23)	0,08
	<i>Met</i>	0,37	0,26		

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher

A Tabela 21 mostra as comparações das frequências dos genótipos para os genes *XRCC1* e *XRCC3*, quanto ao hábito tabagista. Verificou-se diferença estatisticamente significativa entre pacientes e mulheres saudáveis não-fumantes entre o genótipo heterozigoto e o genótipo *Thr/Thr* ( $P = 0,01$ ) e quando se associou os genótipos *Thr/Met* + *Met/Met* para o gene *XRCC3* ( $P = 0,01$ ).

Observou-se uma diferença significativa entre pacientes e mulheres saudáveis que possuem parentes com câncer quando feita a associação dos genótipos *Arg/Gln* + *Gln/Gln* do gene *XRCC1* ( $P = 0,01$ ) e *Thr/Met* + *Met/Met* do gene *XRCC3* ( $P = 0,01$ ). Uma diferença significativa também foi verificada entre o genótipo heterozigoto e o genótipo *Arg/Arg* ( $P = 0,03$ ) do gene *XRCC1* e entre o genótipo heterozigoto e o genótipo *Thr/Thr* ( $P = 0,01$ ) do gene *XRCC3* (Tabela 22).

**Tabela 21.** Diferentes associações entre os genótipos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* nas amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise molecular de acordo com o hábito tabagista.

Genótipos	Número (%)								
	Não-Fumantes				Fumantes				
	Pacientes (n = 84)	Mulheres saudáveis (n = 135)	OR	P	Pacientes (n = 23)	Mulheres saudáveis (n = 40)	OR	P	
<b>XRCC1</b> <b>Códon</b> <b>399</b>	<i>Arg/Gln</i> vs. <i>Arg/Arg</i>	54 (64,2) vs. 27 (32,2)	86 (49,2) vs. 38 (28,2)	0,88 (0,48 – 1,60)	0,75	12 (52,1) vs. 9 (39,1)	28 (70,0) vs. 11 (27,5)	0,52 (0,17 – 1,59)	0,26
	<i>Gln/Gln</i> vs. <i>Arg/Arg</i>	3 (3,5) vs. 27 (32,2)	11 (8,1) vs. 38 (28,2)	0,38 (0,09 – 1,50)	0,22	2 (8,6) vs. 9 (39,1)	1 (2,5) vs. 11 (27,5)	2,44 (0,18 – 31,54)	0,59
	<i>Arg/Arg</i> vs. <i>Arg/Gln + Gln/Gln</i>	27 (32,2) vs. 57 (67,8)	38 (28,2) vs. 97 (71,8)	1,20 (0,66 – 2,18)	0,54	9 (39,1) vs. 14 (60,8)	11 (27,5) vs. 29 (72,5)	1,69 (0,57 – 5,03)	0,40
	<i>Thr/Met</i> vs. <i>Thr/Thr</i>	42 (50,0) vs. 33 (39,2)	46 (34,0) vs. 76 (56,3)	2,10 (1,17 – 3,77)	0,01*	10 (43,5) vs. 9 (39,1)	10 (25,0) vs. 25 (62,5)	2,77 (0,86 – 8,87)	0,13
<b>XRCC3</b> <b>Códon</b> <b>241</b>	<i>Met/Met</i> vs. <i>Thr/Thr</i>	9 (10,7) vs. 33 (39,2)	13 (9,7) vs. 76 (56,3)	1,59 (0,62 – 4,09)	0,32	4 (17,3) vs. 9 (39,1)	5 (12,5) vs. 25 (62,5)	2,22 (0,48 – 10,16)	0,41
	<i>Thr/Thr</i> vs. <i>Thr/Met + Met/Met</i>	33 (39,2) vs. 51 (60,7)	76 (56,3) vs. 59 (43,7)	0,50 (0,28 – 0,87)	0,01*	9 (39,1) vs. 14 (60,8)	25 (62,5) vs. 15 (37,5)	0,38 (0,13 – 1,10)	0,11

OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança; P: seus valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher

\* Estatisticamente significativo

**Tabela 22.** Diferentes associações entre os genótipos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* nas amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na análise molecular de acordo com o parentesco com pessoas com câncer.

Genótipos	Número (%)								
	Parentes com câncer				Parentes sem câncer				
	Pacientes (n = 59)	Mulheres saudáveis (n = 88)	OR	P	Pacientes (n = 48)	Mulheres saudáveis (n = 87)	OR	P	
<b>XRCC1</b> Códon 399	<i>Arg/Gln</i> vs. <i>Arg/Arg</i>	34 (57,6) vs. 23 (38,9)	62 (70,4) vs. 18 (20,4)	0,42 (0,20 – 0,90)	0,03*	32 (66,7) vs. 13 (27,0)	52 (59,7) vs. 31 (35,6)	1,46 (0,67 – 3,21)	0,43
	<i>Gln/Gln</i> vs. <i>Arg/Arg</i>	2 (33,9) vs. 23 (38,9)	8 (79,5) vs. 18 (20,4)	0,19 (0,03 – 1,03)	0,07	3 (6,25) vs. 13 (27,0)	4 (4,6) vs. 31 (35,6)	1,78 (0,34 – 9,14)	0,66
	<i>Arg/Arg</i> vs. <i>Arg/Gln + Gln/Gln</i>	23 (38,9) vs. 36 (61,0)	18 (20,4) vs. 70 (79,5)	2,48 (1,19 – 5,18)	0,01*	13 (27,0) vs. 35 (73,0)	31 (35,6) vs. 56	0,67 (0,30 – 1,45)	0,34
	<i>Thr/Met</i> vs. <i>Thr/Thr</i>	31 (52,6) vs. 21 (35,5)	28 (31,8) vs. 49 (55,7)	2,58 (1,25 – 5,32)	0,01*	21 (43,7) vs. 21 (43,7)	28 (32,1) vs. 52 (59,7)	1,85 (0,86 – 3,97)	0,12
	<i>Met/Met</i> vs. <i>Thr/Thr</i>	7 (11,9) vs. 21 (35,5)	11 (12,5) vs. 49 (55,7)	1,48 (0,50 – 4,35)	0,57	7 (14,5) vs. 21 (43,7)	7 (8,0) vs. 52 (59,7)	2,47 (0,77 – 7,93)	0,13
	<i>Thr/Thr</i> vs. <i>Thr/Met + Met/Met</i>	21 (35,5) vs. 38 (64,5)	49 (55,7) vs. 39 (44,3)	0,43 (0,22 – 0,86)	0,01*	21 (43,7) vs. 27 (56,2)	52 (59,7) vs. 35 (40,3)	0,52 (0,25 – 1,06)	0,10

OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança; P: seus valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher

\* Estatisticamente significativo



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Danos basais e induzidos no DNA em pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis

Nos últimos anos, muitos estudos têm somado evidências de que existe uma associação entre câncer de mama, de origem esporádica ou familiar, e o reparo do DNA, sugerindo que uma capacidade de reparo reduzida pode ser determinada geneticamente e conferir suscetibilidade ao CM (Roberts, 1999; Khanna e Jackson, 2001; Smith *et al.*, 2003).

O Teste do MN tem sido freqüentemente utilizado para biomonitoramento, para testes de mutagenicidade e também para avaliar a capacidade de reparo do DNA (Fenech e Morley, 1985). Com base na idéia de que a ocorrência de muitos casos de câncer pode estar associada com uma capacidade reduzida, da pessoa afetada, de reparar danos no DNA, numerosos estudos caso-controle têm sido desenvolvidos nos últimos anos (Berwick e Vineis, 2000).

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a resposta celular aos danos basais e induzidos, *in vitro*, pelo quimioterápico Etoposido em pacientes com CM e em mulheres saudáveis. Para essa avaliação, foi utilizado o Índice de Divisão Nuclear, o Teste do MN e o Ensaio Cometa em linfócitos de sangue periférico humano.

Observou-se, na amostra estudada, que a maioria das pacientes não fez uso de contraceptivo oral, indicando que este não foi um fator de risco ao CM para este estudo. No grupo de mulheres saudáveis, a freqüência de mulheres que não haviam entrado na menopausa foi maior do que no grupo de pacientes, o que era esperado pelo fato da amostra de pacientes ter uma média de idade maior que o grupo de mulheres saudáveis. Todos os outros dados referentes à idade, ao hábito tabagista, à idade da menarca, ao número de gestações, à terapia de reposição hormonal, à idade de primeira gestação e à presença de parentes com câncer apresentaram-se similares entre pacientes e mulheres saudáveis incluídas na análise citogenética e molecular, garantindo assim uma uniformidade da amostra estudada.

No presente estudo, não foi observada diferença significativa quanto ao IDN quando comparados os diferentes tipos de tratamento em cada grupo (pacientes e mulheres saudáveis), bem como quando comparado o mesmo tratamento entre os grupos, sugerindo que as diferentes doses de Etoposido utilizadas não ocasionaram eventos citotóxicos, não interferindo, portanto, na cinética do ciclo celular.

As frequências basais de MN (tratamento controle) tanto no grupo de pacientes com CM quanto no grupo de mulheres saudáveis estão de acordo com os dados de Bolognesi *et al.* (1999). Observou-se um aumento discreto, porém não significativo estatisticamente, na média de MNs no grupo de pacientes, indicando uma sensibilidade destas à indução de MNs pelo Etoposido. Segundo Varga *et al.* (2006), num estudo caso-controle, o aumento na frequência de MNs observada em linfócitos de pacientes com CM esporádico pode ser devido a um defeito de reparo do DNA, resultando num fenótipo celular de aumento de sensibilidade a agentes mutagênicos.

No Teste do MN, foi verificado que somente a maior concentração do Etoposido (25  $\mu\text{M}$ ) no grupo de pacientes com CM foi significativamente diferente do tratamento controle dentro do mesmo grupo, assim como em relação a mesma concentração no grupo de mulheres saudáveis. Essa diferença na indução de MNs pode ser devida ao fato de que as concentrações 5 e 10  $\mu\text{M}$  de Etoposido poderiam ter induzido, de acordo com Vukecevic *et al.* (2004) outras formas de danos genéticos que não resultaram na formação de MNs e, portanto, não elevaram a sua frequência. Além disso, os dados obtidos neste estudo no Teste do MN corroboram com o estudo *in vivo* realizado por Turner *et al.* (2001), onde também foi verificada a indução de danos somente na maior concentração de Etoposido utilizada, indicando que a ação da droga é dose-dependente, ou seja, que pequenas doses do Etoposido induziriam pequenas quantidades de danos, como já verificado por Lebailly *et al.* (1997). Outro fator que poderia influenciar o resultado observado é que quando o Etoposido é removido do meio, os danos no DNA são rapidamente reparados (Wozniak e Ross, 1983; Van Maanen *et al.*, 1988), sugerindo que os danos induzidos nas concentrações

5 e 10  $\mu\text{M}$  poderiam ter sido reparados durante o período de ação da citocalasina B (28 horas).

A diferença na indução de danos encontrada na concentração de 25  $\mu\text{M}$  no Teste do MN, poderia ser explicada pelo fato de não existirem evidências diretas do mecanismo pelo qual ocorre um aumento da indução da frequência de MNs e um aumento na frequência basal de danos em linfócitos de pacientes com câncer, de acordo com Varga *et al.*(2006). Segundo estes autores, ainda, duas possibilidades podem ser consideradas. A primeira seria de que linfócitos de pacientes representam uma subpopulação de células mais sensível quando comparadas a de indivíduos saudáveis. A segunda possibilidade seria de que estes mesmos linfócitos teriam diferentes propriedades com relação a indução de danos no DNA e o reparo.

Atualmente, há um interesse na aplicação do Ensaio Cometa por ser um método simples por isto este tem sido extensivamente utilizado para detectar níveis de danos no DNA em células individuais em testes genotóxicos e de biomonitoramento sob várias circunstâncias (Singh *et al.*,1998). No entanto, existe conflito nos resultados obtidos no Ensaio Cometa em estudos com pacientes com câncer. Muitos pesquisadores encontraram uma grande sensibilidade a quebras de fitas simples e redução na capacidade de reparo em linfócitos de sangue periférico destes pacientes (Vaghef *et al.*, 1997), enquanto outros não reportaram diferenças na sensibilidade ou capacidade de reparo em estudos *in vitro* em linfócitos de sangue periférico expostos a agentes mutagênicos químicos (Jaloszynski *et al.*, 1997).

Foi observado um mesmo escore de danos basais no DNA (tratamento controle) em pacientes com CM e em mulheres saudáveis. Isso poderia ser explicado pelo protocolo de tratamento do nosso estudo. Os linfócitos, após coletados, foram colocados em cultura por 24 horas e isso seria tempo suficiente para que a maquinaria de reparo agisse, excluindo desta forma danos pré-existentes.

No Ensaio Cometa foi verificada diferença significativa entre o tratamento controle e os tratamentos com Etoposido (5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ ) somente em  $T_1$  para ambos os grupos



estudados (pacientes e mulheres saudáveis). Estes níveis de danos no DNA, após 1 hora de tratamento, tiveram um aumento gradativo do escore com o aumento da concentração de Etoposido (5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ ), indicando mais uma vez que a ação da droga é dose-dependente (Lebailly *et al.*, 1997), ou seja, que mesmo pequenas quantidades de danos induzidos pelo Etoposido puderam ser detectadas no Ensaio Cometa devido a sua alta sensibilidade.

Após 4 horas de incubação ( $T_2$ ), os níveis de danos em ambos os grupos de estudo foram menores e próximos aos níveis de danos basais encontrados em  $T_0$ , indicando que possivelmente ocorreu o reparo destes danos. Segundo Wozniak e Ross (1983) e Van Maanen *et al.* (1988), os danos induzidos no DNA pelo Etoposido são rapidamente reparados quando este é removido do meio e isto também poderia ter contribuído para que os níveis de danos em  $T_2$  fossem próximos aos encontrados em  $T_0$  no grupo de pacientes e no grupo de mulheres saudáveis.

Em relação as diferenças observadas nos danos induzidos no Teste do MN e no Ensaio Cometa para os tratamentos com Etoposido nas concentrações 5 e 10  $\mu\text{M}$ , se deve ao fato que o Ensaio Cometa e outros testes citogenéticos detectam tipos diferentes de alterações no DNA: o Ensaio Cometa detecta lesões reparáveis no DNA ou sítios alkali-lábeis enquanto outros testes citogenéticos (Teste do MN e Aberrações Cromossômicas) detectam mutações fixadas que persistem até depois de um ciclo de divisão. Além disso, a natureza do agente genotóxico estudado e o tempo entre a exposição e a análise podem contribuir para as diferenças de sensibilidade entre o Ensaio Cometa e outros testes citogenéticos (Kassie *et al.*, 2000).

Na análise dos resultados obtidos no Teste do MN e Ensaio Cometa, foi levada em consideração a possível influência da idade nos danos observados, uma vez que o envelhecimento pode estar associado aos processos de instabilidade genética (Vijg, 2004).

Em relação ao critério idade, não foi encontrada diferença significativa no Teste do MN para as diferentes faixas etárias tanto no grupo de pacientes quanto no grupo de mulheres saudáveis. Porém, pode-se observar uma maior sensibilidade na indução de MNs no grupo de pacientes acima de 40 anos em relação a essa mesma faixa etária no grupo de

mulheres saudáveis nos danos basais encontrados na cultura controle e nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$  de Etoposido. Segundo Bolognesi *et al.* (1999), existe uma relação da idade com o aumento de frequência espontânea de MNs em linfócitos de sangue periférico, podendo interferir na divisão celular e modificar a porcentagem de células binucleadas, resultando numa capacidade proliferativa reduzida.

Quando o critério idade foi adotado para o Ensaio Cometa, verificou-se a influência deste fator apenas no grupo de pacientes ( $\leq 45$  e  $> 45$  anos) e na comparação entre pacientes e mulheres saudáveis com idade  $\leq 45$  anos, em  $T_1$ , ambas as situações para a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de Etoposido. Essa significância deve-se, mais uma vez, a dose-dependência do Etoposido (Lebailly *et al.*, 1997), ou seja, que pequenas quantidades de danos induzidas por ele puderam ser detectadas no Ensaio Cometa devido a sua alta sensibilidade.

Os resultados a respeito da influência do tabagismo sobre os níveis basais de danos no DNA ainda são controversos. No presente estudo, não foi verificada diferença entre fumantes e não-fumantes, em ambos os testes, no tratamento controle (níveis basais de danos). Estes resultados estão de acordo com Hoffmann e Speit (2005) e Bonassi *et al.* (2007) que não observaram nenhuma diferença significativa entre fumantes e não-fumantes no Teste do MN e no Ensaio Cometa.

No Ensaio Cometa, verificou-se uma diferença significativa entre o grupo de mulheres saudáveis fumantes e não-fumantes nos tratamentos com Etoposido nas concentrações 10 e 25  $\mu\text{M}$ . Isso poderia ser explicado pelo fato de que as pacientes com CM possuem níveis de danos no DNA mais altos que as mulheres saudáveis e, neste caso, os danos induzidos no grupo de pacientes não foram suficientemente grandes para serem estatisticamente significativos, o que não ocorreu para o grupo de mulheres saudáveis que, por possuírem níveis de danos no DNA menores, qualquer indução elevará estes níveis o suficiente para que seja observada uma diferença significativa.

Neste estudo não foi feita uma associação entre os resultados do Teste do MN e Ensaio Cometa em relação aos genótipos, porque segundo Iarmarcovai *et al.* (2008), essa

associação é limitada pelo tamanho do grupo de estudo, que geralmente é pequeno para avaliar polimorfismos raros, e a análise estatística para estes pequenos grupos geralmente é inapropriada, gerando resultados falso-positivos.

## 5.2 Os polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* e a suscetibilidade ao câncer de mama

Os sistemas de reparo do DNA atuam na manutenção da integridade genômica, reparando danos causados à molécula de DNA por fatores endógenos e exógenos, bem como erros surgidos durante a replicação do DNA (Lindahl, 2000). Existe uma forte evidência que variações genéticas são responsáveis por diferentes capacidades de reparo do DNA na população humana. Assim, polimorfismos podem exercer um papel na suscetibilidade individual ao câncer (Hu *et al.*, 2002).

Podem ser citadas duas classes de genes de suscetibilidade ao câncer: (i) genes com variação alélica, que conferem um elevado risco individual para o câncer (genes de alta penetrância); (ii) genes que conferem um baixo ou moderado risco de câncer aos indivíduos que carregam suas variantes alélicas (genes de baixa penetrância) (Rebbeck, 1999). Dentro deste último grupo estão os genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3*.

Mutações no gene *XRCC3* reduzem a taxa de reparo de quebras de fita dupla de 30 a 250 vezes (Brenneman *et al.*, 2000) e segundo Lunn *et al.* (1999), o alelo *399Gln* do gene *XRCC1* também está associado com uma reduzida capacidade de reparo do DNA.

Com base nessas informações, um dos objetivos deste estudo foi avaliar se os polimorfismos *Arg399Gln* do gene *XRCC1* e *Thr241Met* do gene *XRCC3* se associam com o risco ao desenvolvimento do CM. Para isso, foi determinada a frequência desses polimorfismos em uma amostra 107 pacientes com CM do tipo ductal invasor e 175 mulheres saudáveis.

Primeiramente foram estimadas as frequências alélicas dos genes *XRCC1* e *XRCC3* para as amostras do estudo citogenético e do estudo molecular com o intuito de verificar se estas eram semelhantes entre estes dois grupos. Observou-se que as frequências dos alelos *Arg* e *Gln* do gene *XRCC1* no grupo de pacientes com CM para ambas as análises realizadas (citogenética e molecular) foram idênticas (frequência do alelo *Arg* = 0,65 e frequência do alelo *Gln* = 0,35). Duell *et al.* (2001) observaram as mesmas frequências alélicas, em brancos, para o grupo de pacientes com CM em um estudo caso-controle

realizado na Carolina do Norte (EUA). No grupo de mulheres saudáveis essas frequências foram muito próximas entre a amostra do estudo citogenético e a amostra do estudo molecular. O mesmo foi verificado para o gene *XRCC3*, onde as frequências alélicas entre pacientes para ambas as análises realizadas foram iguais (*Thr* = 0,63 e *Met* = 0,37), enquanto para mulheres saudáveis, estas frequências também foram muito próximas. Portanto, o grupo utilizado no estudo citogenético apresenta a mesma variabilidade genética encontrada nos genes *XRCC1* e *XRCC3* para a amostra total estudada.

Não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos alelos variantes nestes genótipos de reparo de DNA entre pacientes com CM e mulheres saudáveis tanto nas amostras do estudo citogenético quanto do estudo molecular, corroborando com um estudo caso-controle de Smith *et al.* (2003).

No presente estudo foram feitas as comparações das frequências genotípicas para ambos os genes em questão no intuito de verificar se existe uma relação do alelo *399Gln* do gene *XRCC1* e o alelo *241Met* do gene *XRCC3* com a suscetibilidade ao CM. Foi verificada uma diferença significativa para o genótipo heterozigoto (*Thr/Met*) assim como quando feita a associação *Thr/Met + Met/Met* do alelo *241Met* para o gene *XRCC3*. Esse resultado mostra que portadores deste alelo são mais frequentes dentro do grupo de pacientes e que, portanto, este alelo estaria associado a uma maior suscetibilidade de desenvolvimento do CM devido a uma possível redução da capacidade de reparo.

Em relação ao gene *XRCC1*, não foi observada nenhuma diferença significativa na amostra estudada quando se comparou pacientes com CM e mulheres saudáveis. Portanto, neste estudo, o polimorfismo *Arg399Gln* não está associado ao risco de CM. Esse resultado está de acordo com os estudos realizados por Loizidou *et al.* (2008), Thyagarajan *et al.* (2006) e Smith *et al.* (2003) que também não encontraram associação deste polimorfismo do gene *XRCC1* com o risco de CM.

Cada genótipo foi testado em associação com fatores tradicionais de aumento do risco de CM: hábito tabagista e histórico de câncer na família. Quando feita a associação *Thr/Met + Met/Met* do gene *XRCC3*, em relação ao hábito tabagista foi observada uma

diferença significativa em pacientes não fumantes, indicando que indivíduos não fumantes portadores do alelo em questão têm uma maior suscetibilidade ao CM. Isto mostra que o hábito tabagista, neste caso, não é um fator de aumento de suscetibilidade ao CM.

Quanto a possuir ou não histórico de câncer na família, foi observada diferença significativa para o genótipo heterozigoto *Arg/Gln* e quando feita a associação *Arg/Gln* + *Gln/Gln*, ambos sendo mais freqüentes em mulheres saudáveis, podendo-se dizer que o alelo variante em questão não está relacionado ao aumento de risco ao CM. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Smith *et al.* (2003), que também não encontraram nenhuma relação significativa entre o histórico familiar de câncer e o alelo variante *399Gln* do gene *XRCC1*.

## CONCLUSÕES

---

---

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo propôs-se investigar se havia diferença entre os níveis de danos basais e a resposta celular aos danos induzidos *in vitro* no DNA pelo Etoposido entre pacientes com CM, virgens de qualquer tratamento quimio/radioterápico e mulheres saudáveis utilizadas como controles. Além disso, estabelecer a frequência dos polimorfismos de dois genes de reparo e a relação destes polimorfismos com a suscetibilidade ao CM no grupo de pacientes com CM e mulheres saudáveis. Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. No Teste do MN, foi observada dentro do grupo de pacientes uma diferença significativa na frequência de MN entre a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de Etoposido e o tratamento controle e quando comparados os grupos de pacientes e mulheres saudáveis nesta mesma concentração, demonstrando uma sensibilidade maior do grupo de pacientes aos danos induzidos pelo Etoposido..
2. Os grupos de pacientes e mulheres saudáveis responderam igualmente aos danos induzidos no Ensaio Cometa em todos os tratamentos utilizados, não havendo, portanto, diferença significativa entre os dois grupos de estudo.
3. Ainda no Ensaio Cometa, em relação ao tratamento com o Etoposido, pacientes e mulheres saudáveis tiveram a mesma capacidade de reparar os danos induzidos por este em 4 horas de reincubação.
4. Quando feita a fragmentação das faixas etárias considerando-se intervalos de 15 anos, verificou-se que a idade não influenciou nas frequências de células com MNs, tanto no grupo de pacientes quanto no grupo de mulheres saudáveis.



5. O hábito tabagista, na amostra estudada de pacientes e mulheres saudáveis, não interferiu nas frequências de MNs.
6. Pacientes acima de 45 anos apresentaram um grau maior de sensibilidade aos danos induzidos pelo Etoposido na concentração de 25  $\mu$ M quando comparadas com pacientes abaixo de 45 anos avaliadas no Ensaio Cometa.
7. Mulheres saudáveis abaixo de 45 anos são mais sensíveis aos danos induzidos pelo Etoposido quando avaliadas no Ensaio Cometa.
8. O hábito tabagista, no Ensaio Cometa, parece contribuir para o aumento da sensibilidade à indução de danos pelo Etoposido somente nos tratamentos de 10 e 25  $\mu$ M no grupo de mulheres saudáveis no tempo T<sub>1</sub>.
9. A frequência aumentada do alelo *241Met* no grupo de pacientes para o gene *XRCC3* em ambos os grupos de análises (citogenética e molecular) sugere uma diminuição da capacidade de reparo das mulheres portadoras deste alelo, o que confere um risco aumentado ao CM.
10. Não foi encontrada associação do polimorfismo *Arg399Gln* do gene *XRCC1* com o risco ao CM mesmo quando associado a fatores como hábito tabagista e a presença de familiares com câncer.
11. O alelo *241Met* do gene *XRCC3* em pacientes não fumantes parece estar associado ao risco aumentado para o CM, podendo-se dizer, portanto, que o hábito tabagista neste caso não é um fator de aumento de suscetibilidade ao CM.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERTINI RJ, ANDERSON D, DOUGLAS GR, HAGMAR L, HEMMINKI K, MERLO F, NATARAJAN AT, NORPPA H, SHUKER DE, TICE R, WATERS MD, AITIO A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463:111–172.

BAGULEY BC, FERGUSON LR (1998). Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta.*, 1400:213-222.

BERWICK M, VINEIS P (2000). Markers of DNA repair susceptibility to cancer in humans: an epidemiological review. *J Natl Cancer Inst*, 92:847-897.

BISHOP DK, EAR U, BHATTACHARYYA A, CALDERONE C, BECKETT M, WEICHSELBAUM RR, SHINOHARA A (1998). XRCC3 is required for assembly of Rad51 complexes *in vivo*. *J Biol Chem*, 273:21482-21488.

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, MONTAGUD AH, TINNERBERG H, FORNI A, HEIKKILÄ P, WANDERS S, WILHARDT P, HANSTEEN IL, KNUDSEN LE, NORPPA H (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res*, 60:1619-1625.

BONASSI S, UGOLINI D, KIRSCH-VOLDERS M, STRÖMBERG U, VERMEULEN R, TUCKER JD (2005). Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives. *Environ Mol Mutagenesis*, 54:258–270.

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDRES M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC 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.

BRENNEMAN MA, WEISS AE, NICKOLOFF JA, CHEN DJ (2000). XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat Res*, 459:89-97.

BRENNEMAN MA, WAGENER BM, MILLER CA, ALLEN C, NICKOLOFF JA (2002). XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell*, 10:387-395.

CALDECOTT KW (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, 2:955-969.

CHRISTMANN M, TOMICIC MT, ROOS WP, KAINA B (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193:3-34.

CLINE SD, HANAWALT PC (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:361-372

COSTA S, PINTO D, PEREIRA D, RODRIGUES H, CAMESELLE J, MEDEIROS TR, SCHMITT F (2007). DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. *Breast Cancer Res Treat*, 103:209-217.

DEBRUIN LS AND JOSEPHY PD (2002). Perspectives on the chemical etiology of breast cancer families. *Environ Health Perspect*, 110:119-128.

DUARTE MC, COLOMBO J, ROSSIT ARB, CAETANO A, BORIM AA, WORNATH D E SILVA AE (2005). Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 11:6593-6600.

DUELL EJ, MILLIKAN RC, PITTMAN GS, WINKEL S, LUNN RM, TSE CKJ, EATON A, MOHRENWEISER HW, NEWMAN B, BELL DA (2001). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10:217-222.

DUMITRESCU RG, COTARLA I (2005). Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, 9:208-221.

EASTMOND DA, TUCKER JD (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Env Mol Mutagen*, 13:34-43.

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

FENECH M, HOLLAND N, CHANG WP, ZEIGER E, BONASSI S (1999). The Human Micronucleus project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*, 428:271–283.

FENECH M (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 455:81-95.

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

FIGUEIREDO JC, KNIGHT JA, BRIOLLAIS L, ANDRULIS IL, OZCELIK H (2004). Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and risk of breast cancer at the Ontario Site of the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13:583-591.

HANDE KR (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34:1514-21.

HELZLSOUER KJ, HARRIS EL, PARSHAD R, PERRY HR, PRICE FM, SANFORD KK (1996). DNA repair proficiency: potential susceptibility factor for breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 88:754-755

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

HU JJ, SMITH TR, MILLER MS, MOHRENWEISER H, GOLDEN A, CASE LD (2001). Amino acid substitution variants APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*, 22:917-922.

HU JJ, MOHRENWEISER HW, BELL DA, LEADON AS, MILLER MS (2002). Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol Appl Pharmacol*, 185:64-73.

HULKA BS, MOORMAN PG (2001). Breast cancer: hormones and other risk factors. *Mauritas*, 38:103-13.

IARMARCOVAI G, BONASSI S, BOTTA A, BAAN RA, ORSIÈRE T (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review on the literature. *Mutat Res*, 658:215-233.

INCA: Instituto Nacional do Câncer (2008). Home Page: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)

JACOBSEN NR, RAASCHOU-NIELSEN O, NEXØ B, WALLIN H, OVERVAD K, TJØNNELAND A, VOGEL U (2004). XRCC3 polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer Lett*, 213:67-72.

JACKSON SP (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks *Carcinogenesis*, 23:687-696.

JALOSZYNSKI P, KUJAWSKI M, CZUB-SWIERCZEK M, MARKOWSKA J, SZYFTER K (1997). Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat Res*, 385:223-233.

JEMAL A, GRAUBARD BI, DEVESA SS, FLEGAL KM (2002). The association of blood lead level and cancer mortality among whites in the United States. *Environ Health Perspect*, 110:325-9.

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

JYOTHISH B, ANKATHIL R, CHANDINI R, VINODKUMAR B, NAYAR GS, ROY DD, MADHAVAN J, NAIR MK (1998). DNA repair proficiency: potential marker for identification of high risk members in breast cancer families. *Cancer Lett*, 124:9-13.

KARRAN P (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*, 10:144-150.

KASSIE F, PARZEFALL W, KNASMÿLLER S (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 463:13-31.

KHANNA KK, JACKSON SP (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27:247-254.

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

KIMURA M, UMEGAKI K, HIGUCHI M, THOMAS P, FENECH M (2004). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr*, 134:48–56.

LEBAILLY P, VIGREUX C, GODARD T, SICHEL F, BAR E, LETALAËR JY, HENRY-AMAR M, GAUDUCHON P (1997). Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazin and chlorothanoliil) in human lymphocytes with comet assay. *Mutat Res*, 375:205-217.

LINDHAL T (2000). Supression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res*, 462:129-135.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J (2002). Análise genética em biologia molecular. In: Nader HB, editor. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 255-93.

LOIZIDOU MA, MICHAEL T, NEUHAUSEN SL, NEWBOLD RF, MARCOU Y, KAKOURI E, DANIEL M, PAPADOPOULOS P, MALAS S, KYRIACOU K, HADJISAVVAS A (2008). Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res Treat*, Epub ahead of print.

LUNN RM, LANGLOIS RG, HSIEH LL, THOMPSON CL, BELL DA (1999). XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B<sub>1</sub> – DNA adducts and glycoporphin A variant frequency. *Cancer Res* 1999, 59:2557 -2561.

MATULLO G, PALLI D, PELUSO M, GUARRERA S, CARTURAN S, CELENTANO E, KROGH V, MUNNIA A, TUMINO R, POLIDORO S, PIAZZA A, VINEIS P (2001). XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*, 22:1437-1445.

NORPPA H (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms *Toxicol Lett*, 149:309–334.

OLDENBURG RA, MEIJERS-HEIJBOER H, CORNELISSE CJ, DEVILEE P (2007). Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol*, 63:125-149.

PACHKOWSKI BF, WINKEL S, KUBOTA Y, SWENBERG JA, MILLIKAN RC, NAKAMURA J (2006). XRCC1 genotype and breast cancer: functional studies and epidemiologic data show interactions between XRCC1 codon 280 His and smoking. *Cancer Res*, 66:2860-2868.

RAFII S, LINDBLOM A, REED M, MEUTH M, COX A (2003). A naturally occurring mutations in an ATP-binding domain of the recombination repair genes XRCC3 ablates its function without causing cancer susceptibility. *Hum Mol Genetics*, 12:915-923.

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

ROBERTS SA, SPREADBOROUGH AR, BULMAN B, BARBER JB, EVANS DG, SCOTT D (1999). Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? *Am J Hum Genet*, 65:784-794, 1999.

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.

SILVA MN, FERREIRA VF, SOUZA MCBV (2003). Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -a e derivados. *Quim Nova*, 26:407-416.

SIMON GR, LUSH RM, GUMP J, TETTEH L, WILLIAMS C, CANTOR A, ANTONIA S, GARRETT C, ROCHA-LIMA C, FISHMAN M, SULLIVAN DM, MUNSTER PN (2006). Sequential oral 9-nitrocamptothecin and etoposide: a pharmacodynamic- and pharmacokinetic-based phase I trial. *Mol Cancer Ther*, 5:2130-2137.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL (1998). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175:184-191.



SMITH TR, MILLER MS, LOHMAN K, LANGE EM, CASE LD, MOHRENWEISER HW, HU JJ (2003). Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett*, 190:183-190.

SMITH TR, LEVINE EA, PERRIER ND, MILLER MS, FREIMANIS RI, LOHMAN K, CASE LD, XU J, MOHRENWEISER HW, HU JJ (2003). DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12:1200-1204.

SPEIT G (1995). Protocol for the application of the alkaline single cell gel test (SCG - Test or Comet - Assay) to detection of DNA damage in eukaryote cells. *Publicação avulsa*.

TEBBS RS, ZHAO Y, TUCKER JD, SCHEERER JB, SICILIANO MJ, HWANG M, LIU N, LEGERSKI RJ, THOMPSON LH (1995). Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 92:6354-6358.

TENG LS, ZHENG Y, WANG HH (2007). BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9:85-9.

THACKER J, ZDZIENICKA MZ (2003). The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA repair (Amst)*, 2:655-672.

THYAGARAJAN B, ANDERSON KE, FOLSON AR, JACOBS JR DR, LYNCH CF, BARGAJE A, KHALIQ W, GROSS MD (2006). No association between XRCC1 and XRCC3 gene polymorphisms and breast cancer risk: Iowa Women's Health Study. *Cancer Detect Prev*, 30:313-321.

THOMPSON LH, BACHINSKI LL, STALLINGS RL, DOLF G, WEBER CA, WESTERVELD A, SICILIANO MJ (1989). Complementation of repair gene mutations on the hemizygous chromosome 9 in CHO: a third repair gene on human chromosome 19. *Genomics*, 5:670-679.

TURNER SD, WIJNHOFEN SWP, TINWELL H, LASHFORD LS, RAFFERTY JA, ASHBY J, VRIELING H, FAIRBAIRN LJ (2001). Assays to predict the genotoxicity of the chromosomal mutagen etoposide-focussing on the best assay. *Mutat Res*, 493:139,147.

VAGHEF H, NYGREN P, EDLING C, BERGH J, HELLMAN B (1997). Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat Res*, 395:127-138.

VAN MAANN JMS, RETEL J, DE VRIES J, PINEDO HM (1988). Mechanism of action of antitumour drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst*, 80:1526-1533.

VARGA D, HOEGEL J, MAIER C, JAINTA S, HOEHNE M, PATINO-GARCIA B, MICHEL 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.

VUKECEVIC V, KAMPFINGER K, STOPPER H (2004). Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency. *Toxicol Letters*, 147:187-195.

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

WEST SC (2003). Molecular view of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:435-445.

WINSEY SL, HALDAR NA, MARSH HP, BUNCE M, MARSHALL SE, HARRIS AL, WOJNAROWSKA F, WELSH KI (2000). A variant within the DNA repair gene *XRCC3* is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res*, 60:5612-5616.

WOOD RD, MITCHELL M, LINDAHL T (2005). Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res*, 577:275-83.

WOZNIAK AJ, ROSS WE (1983). DNA damage as a basis for 4-demethylepipodophyllo-toxicity. *Cancer Res*, 43:120-124.

YAMADA NA, HINZ JM, KOPF VL, SEGALLE KD, THOMPSON LH (2004). ATPase activity is required for normal *XRCC3*-*Rad51C* complex dynamics and homologous recombination. *J Biol Chem*, 279:23250-23254.



---

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

**Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 3633-1000 - Fax: 3633-1144**

**CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO**

## **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**NOME DA PESQUISA: Polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* e a resposta aos danos induzidos no DNA pelo Etoposido em pacientes com câncer de mama.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ANA CLAUDIA TEIXEIRA**

Prezada doadora, apesar de intensivos estudos, o câncer de mama continua sendo o líder da causa de mortes em mulheres. Devido ao fato de a maioria das drogas usadas no tratamento do câncer de mama interagirem com o DNA do indivíduo gerando danos nessa molécula, estudos sobre esses danos e a resposta às drogas devem ser intensificados com a finalidade de ajudar na seleção de regimes de tratamentos e doses individualizados mais eficazes. O objetivo deste projeto é determinar a frequência de alguns genes na população brasileira e verificar se existe uma relação entre esses genes e a sensibilidade celular de cada indivíduo diante das drogas utilizadas na quimioterapia. Nessa pesquisa será necessária a participação de mulheres com câncer de mama e mulheres saudáveis, que serão utilizadas como controle na pesquisa. Concordando em participar deste estudo, serão retirados 20ml de sangue que será colhido por pessoal treinado, utilizando material descartável, sendo a picada da agulha o único desconforto a que será submetida. O material coletado será guardado em tubos rotulados de modo que a doadora não possa ser identificada, mantendo, assim, o caráter confidencial da informação. Uma vez acabada a investigação, ou caso a doadora não continuar participando da mesma, o material será descartado, não podendo ser utilizado para nenhum outro fim. Os dados obtidos estarão disponíveis caso a doadora queira ter conhecimento de tais informações. Sua participação não trará nenhum prejuízo à continuidade do tratamento, assim como não será remunerada nem terá despesas com a mesma, estando livre para retirar seu consentimento, deixando de participar da pesquisa a qualquer momento.

---

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

EU \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ R.G. nº: \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao meu tratamento;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

PACIENTE CONTROLE 

CÓDIGO:

Data P.A: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data do Retorno: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data da Coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_

NOME:

\_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_

IDADE:

\_\_\_\_\_

NACIONALIDADE: \_\_\_\_\_

ETINIA:

\_\_\_\_\_

LOCAL \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_

NASCIMENTO:

\_\_\_\_\_

ENDEREÇO

ATUAL:

\_\_\_\_\_

CIDADE: \_\_\_\_\_

TELEFONE P/ CONTATO:

\_\_\_\_\_

MENARCA: \_\_\_\_\_

MENOPAUSA:

\_\_\_\_\_

FAZ USO DE HORMÔNIOS:  SIM  NÃO / QUAIS:

\_\_\_\_\_

TEMPO DE USO DE HORMÔNIOS:

\_\_\_\_\_

N° DE FILHOS: \_\_\_\_\_ N° DE GRAVIDEZES:

\_\_\_\_\_

IDADE DA 1ª GESTAÇÃO: \_\_\_\_\_

JÁ TEVE ALGUM TIPO DE CÂNCER:  SIM  NÃO/ QUAL?:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

FUMA?:  SIM  NÃO / POR QUANTO TEMPO?:

HÁ QTO TEMPO PAROU DE FUMAR?:

CONVIVE COM PESSOAS QUE FUMAM?:  SIM  NÃO

FAZ USO DE BEBIDA ALCOÓLICA?:  SIM  NÃO /HÁ QTO TEMPO?: \_\_\_\_\_

QTO BEBE POR DIA?:

FAZ USO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES:  SIM  NÃO /QUAIS?: \_\_\_\_\_

FAZ OU JÁ FEZ USO DE DROGAS ILÍCITAS:  SIM  NÃO/ POR QTO TEMPO?: \_\_\_\_\_

TEVE ALGUMA VISROSE RECENTEMENTE?:  SIM  NÃO / HÁ QTO TEMPO FOI CURADO?:

VOCÊ FOI SUBMETIDO A ALGUMA RADIOGRAFIA RECENTEMENTE?:  SIM  NÃO / HÁ QTO

TEMPO ATRÁS?:

JÁ FEZ QUIMIOTERAPIA?:  SIM  NÃO / POR QTO TEMPO?:

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](#)