

Aline Poersch

**Avaliação dos danos no DNA e do grau de recuperação
celular em pacientes com câncer de mama submetidas à
quimioterapia**

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

Área de concentração: Genética.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Catarina
Satie Takahashi

RIBEIRÃO PRETO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Poersch, Aline

Avaliação dos danos no DNA e do grau de recuperação celular em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia. Ribeirão Preto, 2009.

119p.: 30cm

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

1. Câncer de mama. 2. Teste do Micronúcleo. 3. Ensaio Cometa. 4. Docetaxel. 5. Epirubicina.

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
- Coodenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico – CNPq
- Fundacao de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistencia do Hospital das Clinicas de Ribeirao Preto/USP – FAEPA-HCRP
- Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto – FMRP/USP
- Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras de Ribeirao Preto – FFCLRP/USP
- Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto – HCFMRP/USP

RESUMO

POERSCH, A. **Avaliação dos danos no DNA e do grau de recuperação celular em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia.** 2009. 119f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, 2009.

A resistência a drogas é considerada o maior impedimento ao sucesso da quimioterapia no tratamento do câncer, e a busca por um método que prediga a resposta individual à quimioterapia ou o resultado prévio do tratamento é muito intensa. Além disso, diferenças substanciais interindividuais são vistas em muitos tratamentos quimioterápicos de câncer, tanto na resposta clínica como na toxicidade. O maior conhecimento da estrutura e função dos genes humanos, dos efeitos das drogas usadas na quimioterapia e da resposta terapêutica a tal tratamento, certamente irá contribuir na quantificação do risco individual, diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer. Os objetivos deste estudo foram avaliar, *in vitro*, a indução de danos no DNA e a recuperação ou sensibilidade celular adquirida frente aos quimioterápicos docetaxel e epirubicina em pacientes com câncer de mama (CM) e em mulheres saudáveis pelo Teste do Micronúcleo (MN), Índice de Divisão Nuclear (IDN) e Ensaio Cometa; determinar a frequência dos polimorfismos gênicos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* pela técnica PCR-RFLP em todos os indivíduos coletados e verificar se existe associação destes polimorfismos com a suscetibilidade ao CM; correlacionar a indução de danos no DNA e a recuperação celular com os genomas individuais relacionados aos polimorfismos gênicos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* e relacionar os dados obtidos *in vitro* e os polimorfismos gênicos com a resposta patológica das pacientes com CM após o término do tratamento quimioterápico. Nos estudos citogenéticos *in vitro* foram realizados cinco tipos de tratamentos: controle negativo, controle de solvente, docetaxel, epirubicina e docetaxel + epirubicina. No Ensaio Cometa, três amostras celulares foram analisadas: imediatamente antes do início do tratamento (T_0), imediatamente após o término do tratamento (T_1) e quatro horas após o término do tratamento (T_2). Foram coletadas 168 amostras de pacientes com CM para análise molecular, sendo que 20 destas amostras foram avaliadas também citogeneticamente, e 187 amostras de mulheres saudáveis, das quais 40 também foram avaliadas citogeneticamente. Em relação ao polimorfismo *CYP3A4*1B*, foi verificada a frequência de 100% do genótipo mais freqüente (AA). Quanto ao polimorfismo *CYP3A5*3*, as frequências genotípicas e alélicas não diferiram significativamente entre pacientes e mulheres saudáveis. Para o polimorfismo *GSTO1*A140D*, foi observada diferença significativa entre pacientes e mulheres saudáveis somente para o genótipo homozigoto polimórfico (AA). Portanto, não foi verificada associação significativa dos polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* com o

risco de desenvolvimento de CM, assim como com a resposta patológica após a quimioterapia neoadjuvante. Além disso, os diferentes genótipos estudados não mostraram associação com os resultados obtidos nos testes citogenéticos utilizados. No Teste do MN, foi observado que pacientes com CM e mulheres saudáveis diferem significativamente quanto à frequência de MNs em todos os tipos de tratamentos utilizados, indicando diferenças quanto à frequência basal de MNs e quanto à indução de danos no DNA. Nas pacientes com CM, ocorreu um acúmulo significativo de danos no DNA durante o tratamento quimioterápico e a idade exerceu influência somente sobre mulheres saudáveis, onde mulheres acima de 45 anos possuem frequência basal de MNs significativamente maior do que mulheres com idade até 45 anos. De acordo com os resultados obtidos no Teste do MN, pacientes com CM fumantes mostraram-se mais suscetíveis aos danos induzidos pelo docetaxel e epirubicina. Não foi observada correlação entre frequência de MNs e a resposta patológica das pacientes com CM submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Pacientes com CM apresentaram valores de IDN significativamente menores do que mulheres saudáveis em todos os tratamentos utilizados e ocorreu uma redução significativa dos valores de IDN durante o tratamento quimioterápico. A idade, o hábito tabagista, os diferentes genótipos analisados não apresentaram correlação com os valores de IDN observados, assim como com os valores de escore de dano (ED) no Ensaio Cometa. No Ensaio Cometa não foram observadas diferenças significativas entre pacientes com CM e mulheres saudáveis nos tratamentos realizados, assim como não foram observadas diferenças significativas entre as amostras coletadas durante a quimioterapia, embora tenha ocorrido um aumento gradual dos valores do ED. Além disso, não houve redução significativa do ED após quatro horas de incubação (T_2) nos dois grupos de estudo, e pacientes com doença residual mínima e resposta patológica completa possuem valores de ED significativamente menores que pacientes com doença residual extensa antes de iniciar o tratamento quimioterápico.

Palavras-chave: Câncer de mama, Teste do Micronúcleo, Ensaio Cometa, Docetaxel, Epirubicina.

ABSTRACT

POERSCH, A. **DNA damage and degree of cell recovery in breast cancer patients submitted to chemotherapy.** 2009. 119f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, 2009.

Drug resistance is considered the major impediment to successful chemotherapy in cancer treatment and the search for a method to predict individual response to chemotherapy or the prior result of treatment is intensive. Furthermore, there are interindividual differences in both clinical response and toxicity in many chemotherapy treatments for cancer. The knowledge of the structure and function of human genes, the effects of drugs used in chemotherapy and therapeutic response will certainly contribute to the quantification of individual risk, diagnosis, prognosis and cancer treatment. The aims of this study were to evaluate the DNA damage induced *in vitro* and recovery or cellular sensitivity acquired by docetaxel and epirubicin in breast cancer (BC) patients and healthy women by Micronucleus Test (MN), Nuclear Division Index (NDI) and Comet Assay; determine the frequency of *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* and *GSTO1*A140D* genetic polymorphisms in all collected samples by PCR-RFLP to investigate the association of these polymorphisms with BC susceptibility; correlate the DNA damage induction and cellular recovery at the individual genomes related to *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* and *GSTO1*A140D* genetic polymorphisms and relate the data obtained *in vitro* and genetic polymorphisms with the pathological response of BC patients after chemotherapy treatment. Five treatments were performed in the cytogenetic study (MN, NDI and Comet Assay): negative control, solvent control, docetaxel, epirubicin and docetaxel + epirubicin. In the Comet Assay, three cell samples were collected: immediately before treatment (T_0), immediately after treatment (T_1) and four hours after treatment (T_2). We collected 168 samples from BC patients for molecular analysis and 20 of these samples were cytogenetically studied, and 187 samples of healthy women and 40 of these were also cytogenetically evaluated. For the *CYP3A4*1B* polymorphism, only the most frequent genotype (AA) was observed in the samples, showing the frequency of 100%. The *CYP3A5*3* polymorphism, the genotypic and allelic frequencies did not differ significantly between patients and healthy women. In the *GSTO1*A140D* polymorphism a significantly difference was observed between patients and healthy women only for the homozygous polymorphic (AA). Therefore, there was no significant association between *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* and *GSTO1*A140D* polymorphisms and the risk of developing BC, as well as pathological response after neoadjuvant chemotherapy. Furthermore, the different genotypes did not influence the results obtained in cytogenetic tests. It was observed that BC patients and healthy women differ significantly in the MNs frequency in all treatments performed, indicating differences in the basal frequency of MNs and in the induction of DNA damage. In

BC patients, the accumulation of DNA damage during chemotherapy is significant and the age only influenced the healthy women group, where women over 45 years have a significantly higher basal frequency of MNs than women aged up to 45 years. Smokers BC patients were more susceptible to damage induced by docetaxel and epirubicin in the MN test. We did not observe a correlation between frequency of MNs and pathological response in BC patients submitted to neoadjuvant chemotherapy. BC patients showed NDI values significantly lower than healthy women in all treatments performed and a significant reduction in NDI during chemotherapy. Age, tobacco habit and the different genotypes analyzed did not show correlation with the NDI values and the values of damage score (DS) in the Comet Assay. It was not observed significant differences between BC patients and healthy women in all treatments performed and between samples collected during chemotherapy in the Comet Assay, despite a gradual increase in the values of DS. Furthermore, no significant reduction in the DS after four hours of incubation (T_2) in both studied groups was observed and patients with minimal residual disease and complete pathological response have DS values significantly lower than patients with extensive residual disease before starting chemotherapy treatment.

Keywords: Breast Cancer, Micronucleus Test, Comet Assay, Docetaxel, Epirubicin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer de mama.....	1
1.2 Citocromos P450 (CYP): CYP3A4 e CYP3A5	4
1.3 Glutathiona S-Transferase Omega (GSTO)	5
1.4 Teste do Micronúcleo.....	6
1.5 Ensaio Cometa - Single Cell Gel Electrophoresis	8
2 OBJETIVOS.....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Casuística	13
3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão	14
3.2 Análise molecular.....	14
3.2.1 Extração de DNA	14
3.2.2 Detecção dos polimorfismos	14
3.2.3 Análise estatística	17
3.3 Avaliação citogenética	17
3.3.1 Cultura de linfócitos.....	18
3.3.2 Controle Negativo.....	18
3.3.3 Controle de Solvente.....	18
3.3.4 Agentes químicos.....	19
3.3.5 Citocalasina B	20
3.3.6 Tratamentos realizados.....	20
3.3.7 Teste do Micronúcleo	21
3.3.8 Ensaio Cometa.....	22
4 RESULTADOS	27
4.1 Amostras coletadas.....	27
4.2 Análise molecular: polimorfismos CYP3A4*1B, CYP3A5*3 e GSTO1*A140D	27
4.2.1 Caracterização geral das amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis coletadas para a análise dos polimorfismos dos genes <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> e <i>GSTO</i>	27

4.2.2 Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados para os genes <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> e <i>GSTO1</i> em pacientes com CM e mulheres saudáveis	30
4.2.3 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos dos genes <i>CYP3A5</i> e <i>GSTO1</i> em pacientes com CM de acordo com características anatomopatológicas.....	32
4.2.4 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos dos genes <i>CYP3A5</i> e <i>GSTO1</i> em pacientes com CM de acordo com a resposta patológica após a quimioterapia neoadjuvante	36
4.3 Análise citogenética: Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa	38
4.3.1 Caracterização geral da amostra de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na avaliação citogenética	38
4.3.2 Distribuição dos genótipos dos genes <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> e <i>GSTO1</i> em pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas também na avaliação citogenética	40
4.3.3 Teste do MN.....	42
4.3.4 Índice de Divisão Nuclear (IDN)	53
4.3.5 Ensaio Cometa.....	61
5 DISCUSSÃO.....	69
5.1 Os polimorfismos dos genes <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> e <i>GSTO</i> e a suscetibilidade ao câncer de mama.....	70
5.2 Danos basais e induzidos no DNA de pacientes com CM e mulheres saudáveis.....	76
5.2.1 Caracterização geral e frequência dos polimorfismos dos genes <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> e <i>GSTO</i> da amostra de avaliação citogenética	76
5.2.2 Teste do MN, IND e Ensaio Cometa.....	77
6 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO	97
ANEXOS.....	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

Apesar de anos de intensivos estudos e substanciais progressos no entendimento da suscetibilidade ao câncer de mama, esta doença permanece como importante causa de morte entre mulheres, representando o maior problema de saúde feminina na maioria dos países industrializados (Olopade e Pichert, 2001; Wooster e Weber, 2003).

No Brasil, o câncer de mama (CM) é o câncer que mais causa mortes entre as mulheres. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2009), o número de casos novos esperados para o ano de 2010 é de 49.240, um risco estimado de 49,27 casos a cada 100.000 mulheres. A maior incidência de câncer de mama está na região Sudeste, com risco estimado de 64,54 casos novos a cada 100.000 mulheres. No estado de São Paulo, especificamente, o risco estimado é de 68,04 casos novos para cada 100.000 mulheres.

Embora a história familiar seja um importante fator de risco para o câncer de mama (Haiman *et al.*, 2000), o câncer de mama de caráter familiar corresponde a aproximadamente 10% do total de casos (Nagy *et al.*, 2004). A idade constitui outro importante fator de risco, havendo um aumento rápido da incidência com o aumento da idade. A menarca precoce, a menopausa tardia, a ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos e a nuliparidade também constituem fatores de risco (Haiman *et al.*, 2000).

O tratamento básico para câncer de mama é cirúrgico. Em aproximadamente 70% dos cânceres de mama, o tratamento consiste na quimioterapia, enquanto os 30% restantes, podem ou não receber tal terapia dependendo do risco de recorrência da doença (Kute *et al.*, 1998).

A quimioterapia neoadjuvante, também chamada de primária, pré-operatória ou de indução, tem sido promissora no tratamento do câncer de mama localmente avançado. Este tipo de quimioterapia consiste na administração dos quimioterápicos antes

do tratamento cirúrgico. As vantagens práticas e teóricas da quimioterapia neoadjuvante são: reduzir o tamanho do tumor e aumentar a taxa de cirurgia conservadora da mama ou tornar operáveis tumores localmente avançados; impedir o crescimento dos focos metastáticos após a remoção do tumor primário; diminuir o potencial de clones químioreistentes; avaliar a sensibilidade tumoral *in vivo* e permitir o estudo dos marcadores biológicos como, por exemplo, os receptores hormonais (Trudeau *et al.*, 2005).

Duas estratégias têm sido usadas na tentativa de aperfeiçoar os resultados da quimioterapia neoadjuvante: o uso de altas doses de clássicas antraciclinas e a incorporação de novas drogas como os taxanos. Antraciclinas e taxanos são as drogas mais ativas contra o carcinoma de mama, com taxa de resposta acima de 30% em doença avançada (Honig, 1996; Nabholz *et al.*, 1999). Devido ao fato de a maioria das drogas usadas no tratamento do câncer de mama interagirem com o DNA, o dano genético pode ser considerado um efeito secundário da terapia (Blasiak *et al.*, 2004).

Para o desenvolvimento de estratégias preventivas é importante a identificação de fatores inerentes e adquiridos que modificam o risco individual de desenvolvimento de câncer (Risch *et al.*, 2001). Fatores de risco adicionais estão sendo investigados e incluem vários polimorfismos (Haiman *et al.*, 2000).

Os polimorfismos podem afetar a suscetibilidade individual a infecções, resposta a drogas ou consumo de álcool, metabolização de xenobióticos, etc. Existem muitos relatos de um maior efeito terapêutico em subpopulações submetidas a doses padrão de drogas devido à sua reduzida capacidade de inativar tais moléculas. Inversamente, podem ser necessárias altas doses de drogas para se obter a resposta terapêutica desejada em indivíduos capazes de eliminar rapidamente a droga (Miller *et al.*, 2001).

Diferenças inerentes na capacidade de metabolizar carcinógenos ambientais é o resultado de polimorfismos genéticos em enzimas metabolizadoras de xenobióticos, o que tem sugerido modificações na suscetibilidade individual ao câncer (Perera e Weinstein, 2000).

A maioria dos carcinógenos genotóxicos que comprovadamente causam tumores em seres humanos são catalisados por enzimas da Fase I, como citocromos P450 (CYP), e neutralizados por enzimas da Fase II, glutatona S-transferases (GSTs), em compostos mais hidrossolúveis, passíveis de serem excretados (Sato *et al.*, 2000).

O uso de técnicas moleculares demonstrou que existem variações qualitativas e quantitativas marcantes na expressão de enzimas CYP e GSTs entre indivíduos de uma mesma ou de diferentes populações e que essas diferenças podem ser um dos fatores que aumentam ou diminuem a suscetibilidade aos efeitos de carcinógenos (Godoy *et al.*, 2002).

Os polimorfismos de enzimas CYP e GSTs são freqüentes, e tanto o tipo quanto a freqüência são étnico-dependentes. Os polimorfismos avaliados em brasileiros mostram até agora freqüências diferentes das obtidas em etnias semelhantes presentes em outros países, provavelmente devido à intensa miscigenação da população brasileira (Amorim *et al.*, 2002; Rossini *et al.*, 2002).

Um vasto número de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) tem sido descoberto em genes que se pensa estarem envolvidos na regulação do metabolismo de drogas; no entanto, relativamente poucos estudos têm sido feitos para se estabelecer uma ligação entre genótipo e eficácia de drogas (Petros *et al.*; 2002). Assim, a rápida evolução no campo da farmacogenética detém boas promessas para ajudar na seleção de regimes de tratamentos e doses individualizados (Nagasubramanian *et al.*, 2003).

Além disso, diferenças substanciais interindividuais tanto na resposta clínica como na toxicidade são comuns para muitos regimes quimioterápicos de câncer, e atualmente os clínicos têm poucas estratégias de monitoramento de drogas que maximizem os índices terapêuticos em pacientes individualmente (Evans *et al.*; 2001).

1.2 Citocromos P450 (CYP): CYP3A4 e CYP3A5

Citocromo P450 é uma superfamília de mono-oxigenases, pertencentes à Fase I de detoxificação, envolvidas na síntese e metabolização de uma ampla variedade de componentes endógenos e exógenos (Gonzalez e Gelboin, 1994). Apesar das diferenças entre as enzimas da família CYP, estas podem se sobrepor em substratos específicos, sendo a regulação da sua expressão, em parte, tecido-específica (Williams e Phillips, 2000).

A enzima CYP3A é conhecida por estar envolvida no metabolismo de muitas drogas de todas as classes terapêuticas (De Wildt *et al.*, 1999). Dentre as drogas metabolizadas via CYP3A estão docetaxel, paclitaxel, irinotecan e tamoxifen, além de ser uma importante enzima envolvida na conversão metabólica de estrogênio endógeno em potenciais carcinógenos (Huang *et al.*, 1998). Múltiplas drogas usadas na prática clínica também são inibidoras da CYP3A, incluindo muitos antiestamínicos, antibióticos e antivirais (Majumdar *et al.*, 2003).

Acredita-se que CYP3A4 e CYP3A5 são as mais importantes isoenzimas CYP450 pertencentes ao metabolismo de drogas, devido à diversidade de drogas sobre as quais agem, assim como a sua relativa abundância em humanos (Gellner *et al.*, 2001).

Petros *et al.* (2005) observaram que polimorfismos no CYP3A4 e CYP3A5 estão associados com uma resposta clínica fraca em pacientes com câncer de mama submetidas ao tratamento com ciclofosfamida. Verificaram que pacientes com uma variante genética na região promotora 5' de CYP3A4 (CYP3A4_A292G; alelo *CYP3A4*1B*) e pacientes com a variante de CYP3A5 (CYP3A5_A6896G; *CYP3A5*3*) tiveram uma sobrevivência reduzida quando comparados com pacientes portadoras das duas cópias do alelo comum. Portanto, esses resultados indicam que a isoenzima CYP3A tem implicações potencialmente dramáticas para a avaliação farmacogenética de muitas drogas usadas hoje clinicamente.

1.3 Glutathione S-Transferase Omega (GSTO)

As glutathione S-transferases (GSTs) constituem uma família de enzimas da Fase II de detoxificação que catalizam a conjugação da glutathione (GSH) em uma ampla variedade de componentes endógenos e exógenos eletrofílicos (Townsend e Tew, 2003). A superfamília GST citosólica humana contém 16 genes subdivididos em oito classes distintas: Alfa, Mi, Pi, Teta, Zeta, Sigma, Ômega e Kapa (Hayes e McLellan, 1999; Board *et al.*, 2000; Ladner *et al.*, 2004).

Em humanos, a classe Ômega de GSTs possui dois genes expressos (*hGSTO1* e *hGSTO2*) e um pseudogene (*hGSTO3p*). *hGSTO1* e *hGSTO2* têm 12,5 e 24,5kb, respectivamente, e estão afastados por 7,5kb no cromossomo 10, entre os marcadores D10S603 e D10S597. Existem três polimorfismos descritos no gene *hGSTO*: *hGSTO1*A140D*, *hGSTO1*E155del* e *hGSTO2*N142D* (Whitbread *et al.*, 2003), mas suas relações com o câncer ainda não são bem exploradas (Marahatta *et al.*, 2006).

GSTO1 utiliza a glutathione em reações e contribui para a biotransformação e comportamento de muitos compostos, incluindo drogas, carcinógenos e produtos do estresse oxidativo (Board *et al.*, 2000). O polimorfismo *GSTO1*A140D* gera uma alteração no aminoácido não-conservativo de resíduo hidrofóbico para hidrofílico (Li *et al.*, 2003; Tanaka-Kagawa *et al.*, 2003). Segundo Tanaka-Kagawa *et al.* (2003), sua atividade reduzida de tiol-transferase pode resultar em uma proteção defeituosa contra o estresse oxidativo celular.

De acordo com Marahatta *et al.* (2006), existe uma associação entre *GSTO1*A140D* e o câncer de mama, e que mais estudos possivelmente ajudarão num melhor entendimento desta relação. Além disso, a exploração dos possíveis papéis desempenhados por *GSTO1* levará a um claro entendimento do significado do polimorfismo genético de *GSTO* no desenvolvimento do câncer.

1.4 Teste do Micronúcleo

O estudo do dano genético ao nível cromossômico é essencial para a genética toxicológica, pois as mutações cromossômicas são um importante evento da carcinogênese. Entre os métodos mais utilizados para avaliar danos cromossômicos destaca-se o Teste do Micronúcleo (MN).

Matter e Schimid (1971) estabeleceram o teste do micronúcleo (MN) em células de medula óssea de camundongos, sendo sua versão *in vitro* (Heddle, 1976), utilizando cultura de linfócitos periféricos humanos, proposta como um teste para a detecção de agentes carcinogênicos. De acordo com Salvadori *et al.* (2003), essa versão evoluiu rapidamente no campo da genética toxicológica por ser um método simples para a avaliação de vários tipos de danos citogenéticos, além das contínuas inovações em seu protocolo que sinalizam para a ampliação da aplicabilidade do teste.

O micronúcleo (MN) pode ser definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal que se forma durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. Desse modo, são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que se perderam do núcleo principal, representando perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou distúrbio no aparato mitótico. Portanto, somente em células que passaram por um ciclo de divisão celular pode-se observar danos no DNA expressos na forma de micronúcleo (Fenech, 1997).

De acordo com Tucker e Preston (1996), o tamanho do micronúcleo permite inferir sobre o mecanismo que o originou, onde grandes micronúcleos seriam decorrentes de falhas no fuso mitótico e conteriam, assim, cromossomos inteiros, e micronúcleos pequenos se originariam a partir de fragmentos de cromossomos. No entanto, a confirmação disso só pode ser feita utilizando-se técnicas de coloração específicas para centrômero, como a de CREST.

Segundo Ferrari (1991) e Titenko-Holland *et al.* (1997), para que uma estrutura seja caracterizada como um micronúcleo, ela deve apresentar as seguintes características: forma arredondada, cor e textura semelhantes à do núcleo principal, estar no mesmo plano do núcleo principal, não estar ligado ao núcleo principal, apresentar tamanho de até 1/3 do núcleo principal e não ser birrefringente.

A contagem de micronúcleos nos ensaios *in vitro* deve ser feita em células binucleadas obtidas com a adição de citocalasina B, o que permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas quando comparada à análise de células mononucleadas (Fenech, 1997). A técnica de obtenção de células binucleadas, introduzida por Fenech e Morley (1985), permite a análise de MN formados na primeira divisão celular após o tratamento com o agente a ser testado.

A citocalasina B é isolada do fungo *Helminthosporium dermatoidium* e atua bloqueando a citocinese, pois impede a polimerização dos filamentos de actina que formam o anel de microfilamentos ao final da divisão celular em células animais (Falck *et al.*, 1997).

O teste do micronúcleo com citocalasina B é atualmente utilizado em estudos *in vivo* (monitoramento genotóxico de populações), *in vitro* (avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e seus possíveis mecanismos de ação) e *ex-vivo* (radiossensibilidade individual) (Salvadori *et al.*, 2003).

O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese apresenta, evidentemente, algumas desvantagens, tais como: ser efetivo somente para populações de células em divisão, não detectar não-disjunção meiótica, não detectar rearranjos cromossômicos, não possibilitar o conhecimento do tipo de aberração que originou o micronúcleo e, além disso, a citocalasina B pode interferir na detecção de compostos que também inibem a citocinese ou a polimerização dos microfilamentos (Salvadori *et al.*, 2003).

De acordo com Maluf e Erdtmann (2003), a análise de micronúcleos, quando comparada, por exemplo, com a análise de aberrações cromossômicas, é mais sensível tanto na detecção de perda cromossômica por lesão no fuso (podendo-se analisar a ocorrência de outras anomalias como pontes entre núcleos e núcleos irregularmente

divididos) como pelo número de células analisáveis, sendo bem menos exigente quanto à formação do analisador e tempo para análise.

1.5 Ensaio Cometa - Single Cell Gel Electrophoresis

O Ensaio Cometa (*single cell gel electrophoresis* – SCGE) visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figuras semelhantes a um cometa.

Os primeiros pesquisadores que utilizaram a quantificação direta do DNA em células individuais foram Rydenberg e Johanson em 1978 (Tice, 1995). Östling e Johanson em 1984 incluíram no teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), o que permitiu um aumento na sensibilidade (Tice, 1995). A eletroforese em pH alcalino (pH>13) foi introduzida por Singh *et al.* (1988) e transformou o cometa em uma técnica poderosa na detecção de quebras no DNA e de danos em sítios álcáli-lábeis, *in vivo* e *in vitro*.

É crescente a utilização de SCGE em pH alcalino, *in vitro*, como teste de genotoxicidade industrial (Hartmann *et al.*, 2001a), também é uma importante ferramenta para avaliação de potencial genotóxico *in vivo* (Hartmann *et al.*, 2001b; Tice *et al.*, 2000).

O Ensaio Cometa é um método rápido, simples e sensível para quantificação de danos genéticos em um pequeno número de células, sendo particularmente valioso na detecção de diferenças intercelulares, nos danos ao DNA e no reparo, em praticamente qualquer suspensão celular eucariótica. Além disto, os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo. A sensibilidade do Ensaio Cometa em detectar danos em células individuais é comparável a outros métodos que avaliam danos em uma população de células (Olive *et al.*, 1992; Fairbairn *et al.* 1995; Ribas, 1995; Ross *et al.*, 1995; Tice, 1995; Klaude *et al.*, 1996; Anderson e Plewa, 1998; Tice *et al.*, 2000; Frieauff *et al.*, 2001). Por todos estes motivos, este teste tem sido empregado na avaliação de danos no DNA promovidos por agentes físicos e químicos, no monitoramento ambiental e até mesmo na área clínica (Anderson e Plewa, 1998).

As várias vantagens também fazem de SCGE uma ferramenta poderosa para evidenciar mecanismos de genotoxicidade *in vivo*. Considerando que o teste pode ser aplicado a qualquer tecido de que se possa obter suspensão celular/nuclear, o SCGE apresenta vantagens em cima de outros em testes, como os aplicáveis somente às células em proliferação (por exemplo, a avaliação de efeito citogenético em células de medula óssea) ou somente em um único tecido. Sendo assim, o SCGE tem uma aplicação promissora como um ensaio suplementar para investigações de mecanismos, semelhante à análise de mutação em sistemas de transgênese. Uma desvantagem é que SCGE não pode identificar efeitos aneugênicos (Hartmann *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a indução de danos no DNA e a recuperação celular em pacientes com câncer de mama submetidas às quimioterapias consecutivas e correlacionar estas informações com os genomas individuais relacionados aos polimorfismos gênicos.

2.2 Específicos

- Determinar a frequência dos polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* em uma amostra saudável da população e em uma amostra de pacientes com CM.
- Avaliar se existe relação entre os polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* e a suscetibilidade individual para o desenvolvimento de CM na amostra de estudo
- Analisar, *in vitro*, a indução de danos no DNA e a recuperação ou sensibilidade celular adquirida frente aos quimioterápicos docetaxel e epirubicina tanto em pacientes com câncer de mama quanto em mulheres saudáveis.
- Relacionar os dados obtidos *in vitro* (danos no DNA e recuperação celular) com os genomas individuais relacionados aos polimorfismos gênicos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D*.
- Relacionar os dados obtidos *in vitro* (danos no DNA e recuperação celular) e os polimorfismos gênicos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* com a resposta patológica das pacientes com câncer de mama após o término do tratamento quimioterápico.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Neste estudo participaram pacientes do sexo feminino atendidas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP-USP), que foram diagnosticadas com câncer de mama de diferentes graus e tipos histológicos além de voluntárias saudáveis, livres de qualquer neoplasia de mama, sendo estas consideradas como grupo controle. As pacientes e voluntárias saudáveis foram selecionadas pela equipe médica do HCRP-USP, coordenada pelos Profs. Drs. Hélio H. A. Carrara e Jurandyr M. Andrade, do Departamento de Ginecologia do HCRP-USP.

Todos os indivíduos selecionados para o estudo foram submetidos a uma entrevista para o esclarecimento dos objetivos e metodologias desta pesquisa e responderam a um questionário para obtenção de informações fundamentais para a análise dos dados obtidos.

Cada indivíduo assinou um termo de consentimento, permitindo o uso de seu sangue para o estudo. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONCEP) (processo HCRP nº 9237/2006).

O material coletado foi 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 queira continuar participando da mesma, o material foi descartado, não podendo ser utilizado para nenhum outro fim.

As amostras de sangue coletadas tiveram dois destinos: análise citogenética (Teste do Micronúcleo, Índice de Divisão Nuclear e Ensaio Cometa), realizada em uma amostra de 60 indivíduos (20 pacientes e 40 mulheres saudáveis, com idade entre 25 e 60 anos) e a análise molecular, realizada com uma amostra total de 355 indivíduos (168 pacientes e 187 mulheres saudáveis).

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

As pacientes selecionadas para este estudo se caracterizaram por apresentar, de acordo com exames patológicos e ultrassonográficos, carcinoma de mama, em sua maioria do tipo ductal, em diferentes estadios clínicos. Não foram selecionadas para este estudo aquelas pacientes que, em algum momento, apresentaram outro tipo de câncer, assim como aquelas submetidas anteriormente a algum tratamento quimioterápico e/ou radioterápico. Além disso, para a avaliação citogenética, especificamente, estas pacientes também deveriam apresentar carcinoma de mama cujo tratamento inicial se restringisse à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirubicina.

Foram selecionadas para o grupo de mulheres saudáveis aquelas que, de acordo com exames ultrassonográfico e/ou patológico, não apresentavam evidências de lesões suspeitas na mama. Semelhantemente ao outro grupo de estudo, estas mulheres não apresentavam outro tipo de câncer, assim como não foram submetidas anteriormente a nenhum tratamento quimioterápico e/ou radioterápico.

3.2 Análise molecular

3.2.1 Extração de DNA

Foi realizada extração de DNA a partir de sangue total das pacientes, utilizando-se o Kit Wizard da Promega, segundo instruções do fabricante.

O DNA foi quantificado por espectrofotometria e estocado na concentração de 100ng/μl à -20°C até o uso.

3.2.2 Detecção dos polimorfismos

Os polimorfismos foram detectados pelas técnicas de PCR-RFLP. Os protocolos das reações de PCR específicas para cada polimorfismo foram obtidos na literatura e foram padronizados para as condições do laboratório.

A seguir, encontram-se os protocolos para cada um dos polimorfismos estudados:

- **Polimorfismo *CYP3A4*1B* do gene *CYP3A4* (Cavalli *et al.*, 2001)**

A transição de A para G na região promotora 5' do gene *CYP3A4* (posição - 290) é demonstrada após a amplificação por PCR usando os primers:

F: 5' **GGAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGCA** 3'

R: 5' **CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG** 3'

A reação foi realizada num volume final de 50 µL contendo: 100 ng de DNA, 75 mM Tris-Cl pH 9, 50 mM KCl, 1 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase. As reações ocorreram em termociclador com uma ativação inicial a 98°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1,5 minutos, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Como resultado da reação, foram obtidos fragmentos de 385 pb.

O material resultante foi digerido pela enzima de restrição *MbolI* a 37°C por 1 hora e aplicado em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio para verificação do tamanho das bandas e/ou extração destas. Os produtos da digestão apresentaram três padrões diferentes: o tipo mais freqüente A/A homocigoto, com fragmentos de 174 pb, 167 pb e 43 pb, um homocigoto polimórfico G/G, com fragmentos de 210 pb e 174 pb, e um heterocigoto A/G, com fragmentos de 210 pb, 174 pb, 167 pb e 43 pb.

- **Polimorfismo *CYP3A5*3* do gene *CYP3A5* (Zhang *et al.*, 2005)**

A alteração de G para A na posição 6896 (alelo *CYP3A5*3*) é demonstrada após a amplificação por PCR usando os primers:

F: 5' **CATGACTTAGTAGACAGATGA** 3'

R: 5' **GGTCCAAACAGGGAAGAAATA** 3'

A reação foi realizada num volume final de 20 µL contendo: 100 ng de DNA, 75 mM Tris-Cl pH 9, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase. As reações ocorreram em termociclador com uma ativação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Como resultado da reação, foram obtidos fragmentos de 293 pb.

O material resultante foi digerido pela enzima de restrição *SspI* a 37°C por 3 horas e aplicado em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio para verificação do tamanho das bandas e/ou extração destas. Os produtos da digestão revelaram a presença de três padrões diferentes: o tipo mais freqüente G/G homozigoto, com fragmentos de 168 pb e 125 pb, um homozigoto polimórfico A/A, com fragmentos de 168 pb, 148 pb, 125 pb e 19 pb, e um heterozigoto G/A, com fragmentos de 148 pb, 125 pb e 19 pb.

- **Polimorfismo *GSTO1**A140D do gene *GSTO1* (Marahatta *et al.*, 2006)**

A transversão polimórfica de C para A no éxon 4 do gene *GSTO1* é demonstrada após a amplificação por PCR usando os primers:

F: 5' **GAACCTTGATGCACCCTTGGT** 3'

R: 5' **TGATAGCTAGGAGAAATAATTAC** 3'

A reação foi realizada num volume final de 50 µL contendo: 100 ng de DNA, 10 mM Tris-Cl pH 9, 50 mM KCl, 1 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂ e 0,5 U de Taq DNA polimerase. As reações ocorreram em termociclador com uma ativação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Como resultado da reação, foram obtidos fragmentos de 254 pb

O material resultante foi digerido pela enzima de restrição *Cac8 I* a 37°C por 18 horas e aplicado em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio para verificação do tamanho das bandas e/ou extração destas. Os produtos da digestão revelaram a

presença de três padrões diferentes: o tipo mais freqüente C/C homozigoto, com fragmentos de 186 pb e 68 pb, um homozigoto polimórfico A/A, com fragmentos de 254 pb, e um heterozigoto C/A, com fragmentos de 254 pb, 186 pb e 68pb.

3.2.3 Análise estatística

Para a análise estatística das diferenças entre os grupos, foram utilizados os Testes Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher (bi-caudal) segundo Agresti (1992) e as razões de probabilidade (*OR: odds ratio*) foram calculadas com intervalos de confiança de 95% (IC) de acordo com Kleinbaum *et al.* (1982).

3.3 Avaliação citogenética

Amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama, submetidas à quimioterapia neoadjuvante e de mulheres saudáveis foram utilizadas, *in vitro*, no Teste do Micronúcleo e no Ensaio Cometa.

Com relação às pacientes com câncer de mama, o sangue foi coletado para a análise citogenética no dia do tratamento quimioterápico, que era realizado, em média, a cada 21 dias, com administração de Farmorubicina[®] RD (Epirubicina) e Taxotere[®] (Docetaxel). Foram coletadas quatro amostras de cada paciente com CM, sendo denominada 0Q a amostra coletada antes de se iniciar o tratamento quimioterápico e 1Q, 2Q e 3Q as amostras coletadas antes da segunda, terceira e quarta sessões de quimioterapia, respectivamente.

Portanto, as coletas de sangue das pacientes com câncer foram realizadas antes do início do tratamento quimioterápico e também antes de cada sessão subsequente de quimioterapia, sendo feita a avaliação da recuperação celular, em média, a cada 3 semanas de quimioterapia.

As culturas *in vitro* das amostras coletadas das pacientes e das mulheres saudáveis foram tratadas com os mesmos quimioterápicos utilizados *in vivo*, a fim de se

avaliar a sensibilidade celular adquirida frente a esse tratamento, assim como a sensibilidade celular de indivíduos saudáveis.

3.3.1 Cultura de linfócitos

A cultura de linfócitos é baseada na metodologia descrita por Moorhead *et al.* (1960):

- Coletar 10 mL de sangue periférico em tubo estéril heparinizado.
- Após 2 horas (tempo para sedimentação e separação das hemácias do plasma), com uma pipeta Pasteur, retirar cuidadosamente cerca de 1,0 mL do plasma + linfócitos.
- Em um frasco de cultura contendo 5 mL de meio RPMI + 20% de soro bovino fetal + 2% de fitohemaglutinina A, semear a mistura de plasma + linfócitos.
- Os frascos de cultura são incubados a 37°C.

3.3.2 Controle Negativo

Como controle-negativo, para cada 5 mL de meio de cultura, foram acrescentados 5 µL de água destilada estéril/ mL de meio de cultura, uma vez que este foi o solvente utilizado na preparação da Epirubicina.

3.3.3 Controle de Solvente

Foi utilizada uma solução de etanol e água (13% de etanol + 87% de água) como controle de solvente, pois esta foi a proporção usada na diluição do docetaxel. O volume utilizado deste controle de solvente foi de 1 µL/ mL de meio de cultura.

3.3.4 Agentes químicos

- **Docetaxel**

O princípio ativo docetaxel (Figura 1) atua promovendo a agregação das tubulinas na formação de microtúbulos estáveis, impedindo a sua despolimerização, o que promove diminuição de tubulina livre. *In vitro*, docetaxel rompe a rede de microtúbulos nas células, essencial para as funções celulares vitais durante a intérfase e mitose, provocando parada do ciclo celular.

O docetaxel foi utilizado em sua fórmula comercial Taxotere® (docetaxel triidratado), fabricado por Aventis Pharma (Inglaterra), na concentração de 0,1 µg/mL de meio de cultura (volume utilizado: 1 µL/ mL de meio de cultura).

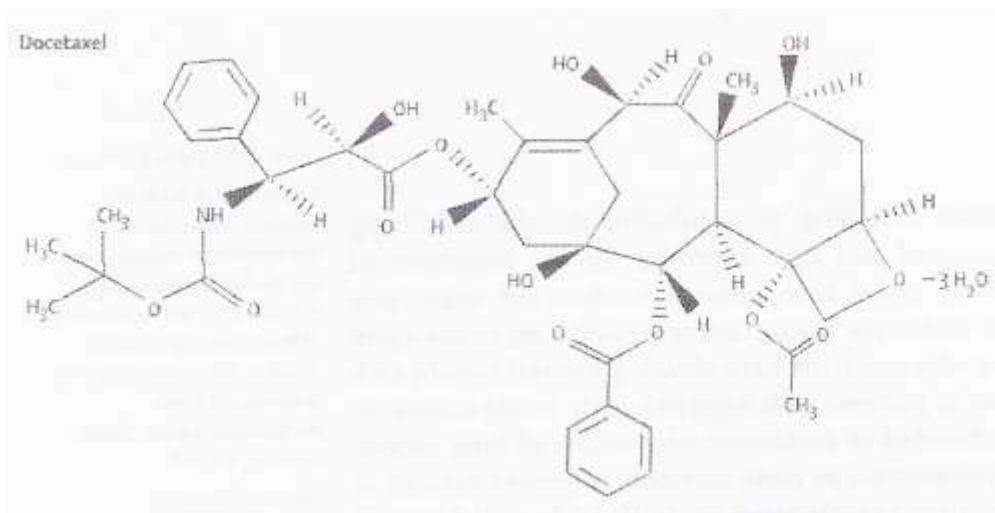


Figura 1: Estrutura química do docetaxel.

- **Epirubicina**

A epirubicina (Figura 2) pode formar um complexo com o DNA por intercalação dos seus anéis planos entre os pares de bases nucleotídicos, com conseqüente inibição da síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e da síntese protéica. Além disso, essa intercalação pode desencadear a quebra do DNA pela topoisomerase II, originando distúrbios sérios na estrutura terciária do DNA. A epirubicina também pode estar envolvida

nas reações de oxidação/redução com a produção de radicais livres altamente reativos e altamente tóxicos.

A epirubicina foi utilizada em sua fórmula comercial Farmorubicina CS (cloridrato de epirubicina), fabricado por Pfizer (Perth) Pty Ltd (Austrália), na concentração de 0,05 µg/ mL de meio de cultura (volume utilizado: 5 µL/ mL de meio de cultura).

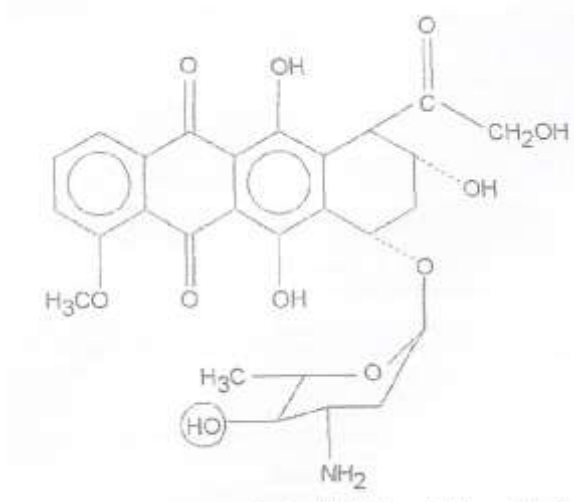


Figura 2: Estrutura química da epirubicina.

3.3.5 Citocalasina B

A citocalasina B (C₂₉H₃₇NO₅ – CAS: 14930-96-2, Sigma) foi diluída em dimethyl-sulfoxide (DMSO - CAS: 67-68-5, Sigma), a fim de se obter uma solução de uso (1 µg/ µL) que foi mantida a 4°C no escuro e utilizada para os experimentos na concentração final de 5 µg/ mL de meio de cultura.

3.3.6 Tratamentos realizados

Nos experimentos *in vitro*, foram constituídos 5 grupos de tratamento para cada um dos testes (Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa): (1) controle-negativo (água destilada – 5 µL/ mL de meio de cultura), (2) controle de solvente (solução de etanol e água – 1 µL/ mL de meio de cultura), (3) docetaxel (0,1 µg/ mL de meio de cultura), (4) epirubicina (0,05 µg/ mL de meio de cultura) e (5) associação dos quimioterápicos (docetaxel +

epirubicina). Todos os tratamentos foram feitos por um período de uma hora em meio livre de soro.

3.3.7 Teste do Micronúcleo

O Micronúcleo (MN) representa perda de cromatina devido a dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico, sendo caracterizado como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal (Fenech, 1997).

Para a realização do Teste do MN, foi adotado o protocolo descrito por Fenech (2000), com algumas adaptações feitas no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que consiste em:

- Após os linfócitos permanecerem em cultura por 44 horas a 37°C, as culturas foram tratadas com as substâncias de interesse e, posteriormente à lavagem das mesmas, foram adicionados 5 µg de citocalasina B/mL de cultura, permanecendo em estufa por mais 28 horas.
- Ao final de 28 horas em contato com a citocalasina B, as culturas foram centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos.
- Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 3 mL de solução hipotônica gelada (citrato de sódio 1%). A suspensão celular foi agitada.
- Imediatamente após, foram adicionados 3 mL de fixador (metanol/ácido acético 2:1) recém-preparado e então foram acrescentadas 4 gotas de formaldeído. A suspensão celular foi agitada.
- A suspensão celular foi novamente centrifugada a 800 rpm por 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante e adicionado 3 mL de fixador. Foi repetido o procedimento anterior mais uma vez.
- Ao final, o sobrenadante foi descartado, deixando aproximadamente 1 mL no tubo, e a suspensão celular restante foi agitada.

- Foram gotejadas 2 a 4 gotas da suspensão celular sobre lâminas previamente lavadas (secas à temperatura ambiente).
- As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos.

A análise foi realizada em microscópio óptico de luz, com aumento de 1000 vezes, sendo analisadas 1000 células binucleadas por tratamento.

3.3.7.a Índice de Divisão Nuclear (IDN)

Para a determinação do Índice de Divisão Nuclear (IDN), 1000 células com citoplasma bem preservado foram analisadas por lâmina (lâmina proveniente do Teste do Micronúcleo) em cada tratamento realizado, utilizando microscópio Zeiss.

O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989) utilizando a fórmula:

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

onde M1 - M4 é o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente, e N é o número total de células viáveis analisadas.

3.3.7.b Análise estatística

Os resultados obtidos no Teste do Micronúcleo e no Índice de Divisão Nuclear foram analisados utilizando-se o Teste Mann-Whitney e as razões de probabilidade foram calculadas com intervalos de confiança de 95%.

As análises foram realizadas pelo software SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific) e pelo software InStat (GraphPad InStat, versão 3.0, GraphPad Software).

3.3.8 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa é altamente sensível na detecção de quebras de fita simples e de sítios alcali-lábeis, não detectando mutações, mas sim lesões genômicas que posteriormente podem resultar em mutações.

Este teste foi iniciado após 24 horas de cultivo, sendo retiradas três alíquotas, em três tempos diferentes: T₀ (imediatamente antes do início do tratamento das culturas), T₁ (imediatamente após o tratamento das culturas) e T₂ (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 adaptações feitas no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto:

- 300 µL de suspensão celular de cada tubo de cultura foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL.
- O material foi centrifugado a 500 rpm por 5 minutos.
- O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" ressuspendido com auxílio de micropipeta.
- Ao "pellet", foram acrescentados 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) a 0,5%.
- Após a homogeneização, o material foi distribuído em uma lâmina recém preparada com uma prévia camada de agarose (ponto de fusão normal (1,5%)).
- A lâmina foi então coberta com uma lamínula por 5 minutos a 4°C.
- Após este período de 5 minutos, a lamínula foi retirada e a lâmina foi mergulhada em uma solução de lise (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) à 4°C, por pelo menos duas horas.
- Posteriormente, as lâminas ficaram em contato com tampão de pH alcalino (NaOH 0,3 M e Na₂EDTA 1 mM, pH > 13) durante 20 minutos, após os quais ocorreu a eletroforese a 25 V (1 V/cm, 300 mA) a 4°C durante 20 minutos.
- Terminada a eletroforese, as lâminas foram mergulhadas em tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos.
- As lâminas foram secas à temperatura ambiente e então fixadas em etanol absoluto por 5 minutos

- Após secarem novamente à temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com 30 μ L de brometo de etídio (0,2 mg/ mL) no momento da análise.

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (ZEISS, filtro 516-560 nm e barreira de filtro de 590 nm), em aumento de 40x. Foram analisadas 100 células/tratamento/indivíduo, sendo incluídas na análise 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:

- 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 = Σ valores de cada classe/ n° de células analisadas

3.3.8.a Análise estatística

Os resultados obtidos no Ensaio Cometa foram analisados utilizando-se o Teste Mann-Whitney e as razões de probabilidade foram calculadas com intervalos de confiança de 95%.

As análises foram realizadas pelo software SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific) e pelo software InStat (GraphPad InStat, versão 3.0, GraphPad Software).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Amostras coletadas

Foram coletadas 168 amostras de pacientes com CM (média de idade de 49,4 anos) e 187 amostras de mulheres saudáveis (média de idade de 45,2 anos), todas utilizadas na análise molecular (PCR-RFLP) (Figura 5).

Na análise citogenética (Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa), foram utilizadas 20 amostras de pacientes com CM (média de idade de 44,7 anos) do total de 168 amostras, e 40 amostras de mulheres saudáveis (média de idade de 42,9 anos) do total de 187 amostras (Figura 5).

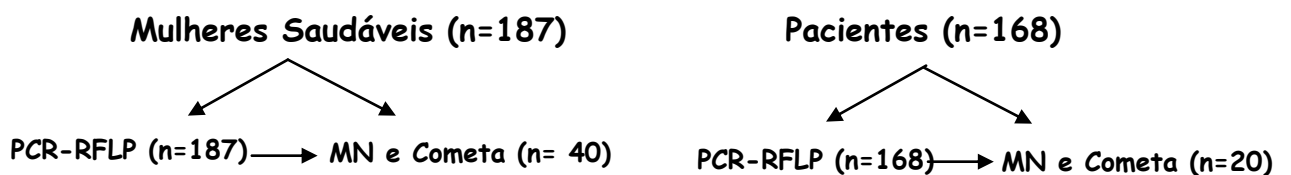


Figura 5: Amostras coletadas para análise molecular (PCR-RFLP) e citogenética (Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa).

4.2 Análise molecular: polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D*

São apresentados a seguir, os dados referentes ao estudo dos polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* em amostras de pacientes com CM e em amostras de mulheres saudáveis.

4.2.1 Caracterização geral das amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis coletadas para a análise dos polimorfismos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO*

A caracterização da amostra populacional quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca e da menopausa, utilização de hormônios (contraceptivos ou terapia de reposição hormonal), número de gestações e existência de familiares com câncer está apresentada na Tabela 1.

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de estudo quanto à distribuição entre as duas faixas etárias, hábito tabagista e idade da menarca.

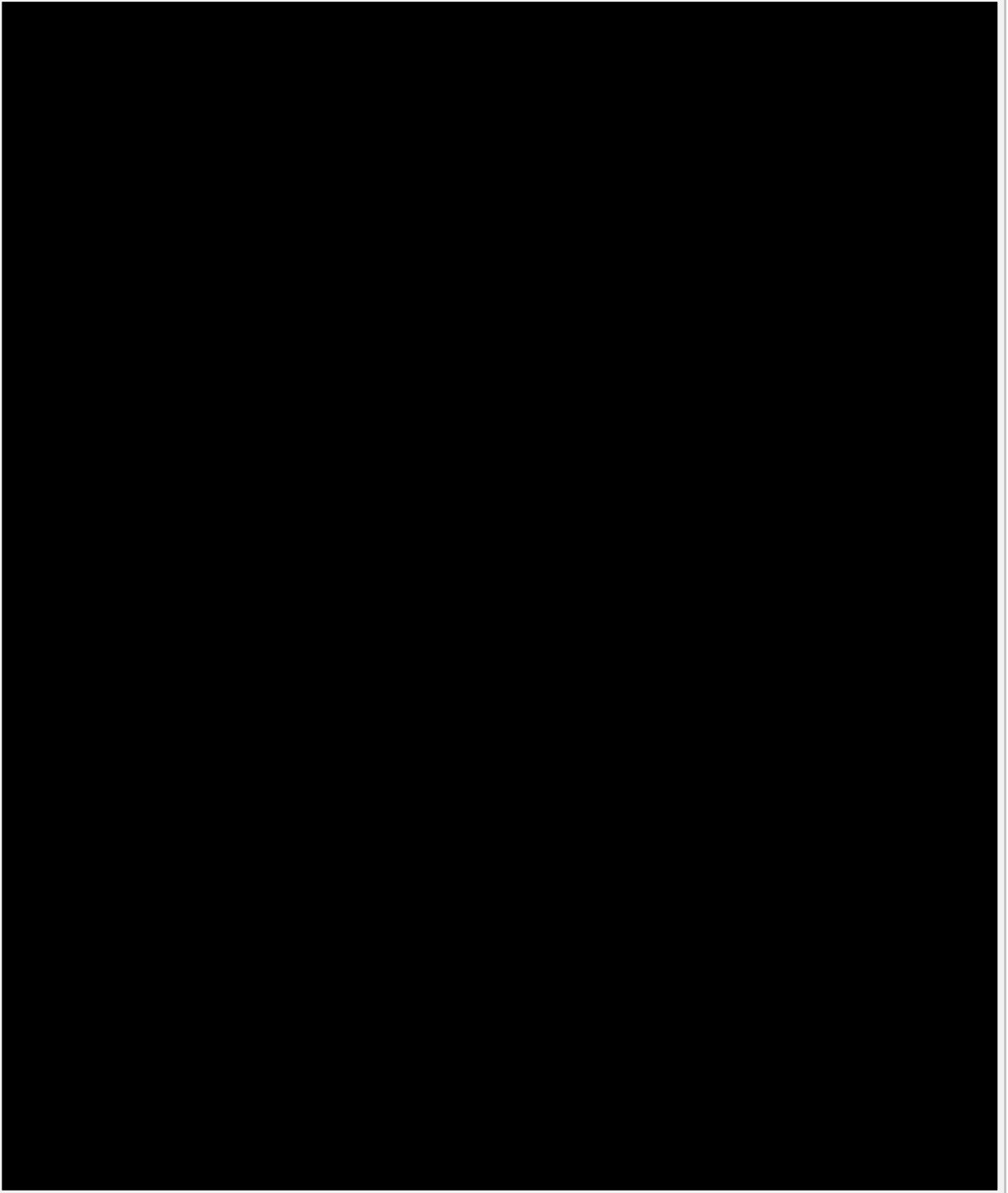
Quanto ao uso de hormônios, também não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, destacando o fato de que, tanto em pacientes quanto em mulheres saudáveis, observa-se uma prevalência do uso de contraceptivos e da não utilização de terapia de reposição hormonal.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de estudo quanto ao parâmetro menopausa, com destaque para o fato de a maioria das pacientes com CM (53,0%) ter desenvolvido a doença em pré-menopausa.

A maioria das pacientes com CM (79,2%) e das mulheres saudáveis (75,9%) teve a sua primeira gestação antes dos 30 anos. Ainda quanto à idade da primeira gestação, foi observada diferença significativa entre os dois grupos de estudo devido ao maior número de pacientes com sua primeira gestação depois dos 30 anos (11,3%) e ao maior número de mulheres saudáveis nuligestas (sem filhos) (21,4%).

Por fim, não se observou diferença significativa entre os dois grupos quanto à presença de familiares com câncer, destacando maior frequência de indivíduos sem história de câncer na família nos dois grupos.

Tabela 1: Caracterização do grupo de pacientes com CM e do grupo de mulheres saudáveis quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca, menopausa, uso de hormônios, idade da primeira gestação e histórico familiar de câncer, utilizadas para o estudo dos polimorfismos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO*.



Teste Exato de Fisher com $\alpha = 0,05$; *: estatisticamente significativo; NI: não informado; NEC: não se encaixa no critério.

4.2.2 Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados para os genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO1* em pacientes com CM e mulheres saudáveis

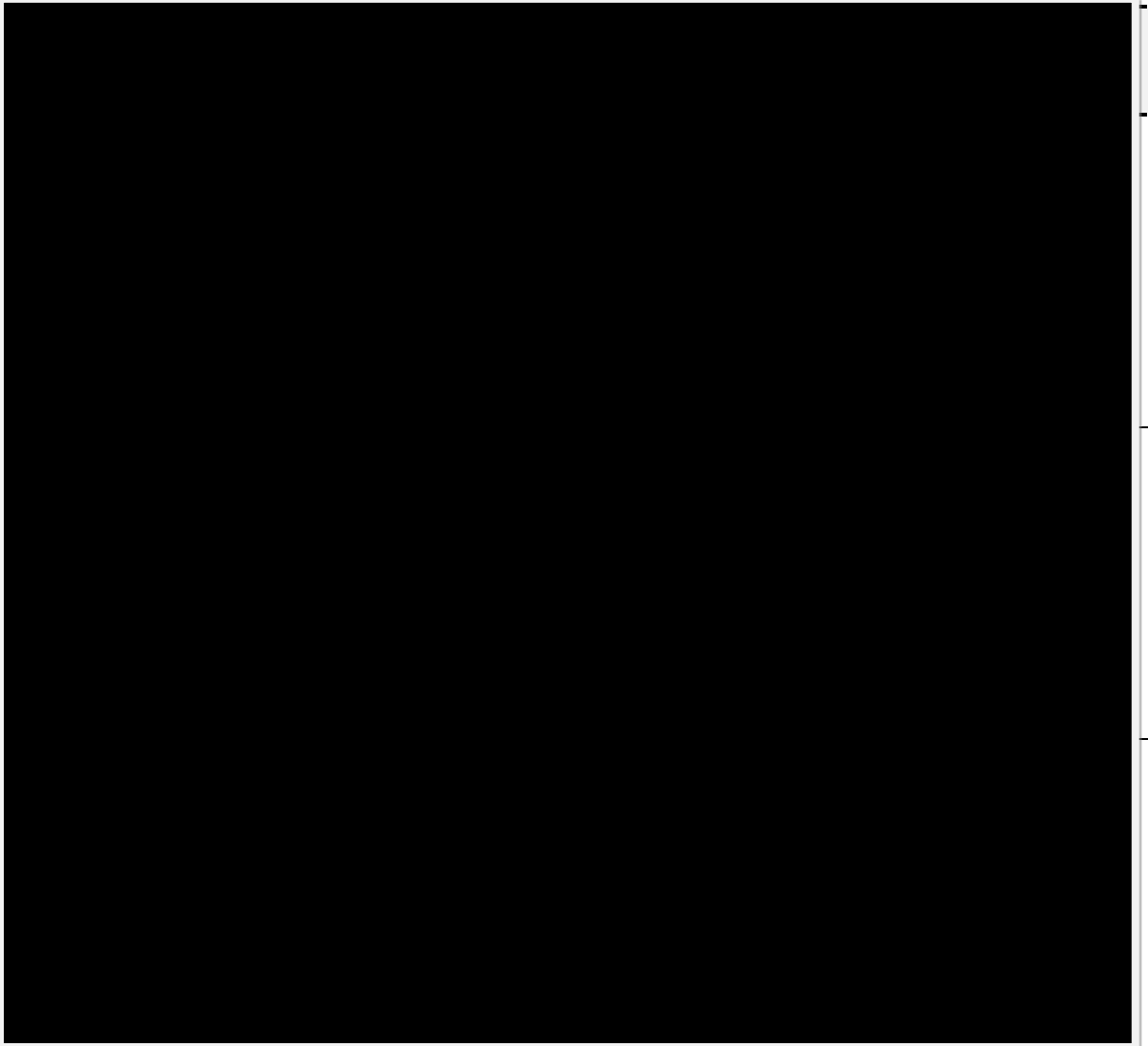
A distribuição das freqüências genóticas e alélicas para os genes *CYP3A4* (polimorfismo *CYP3A4*1B*), *CYP3A5* (polimorfismo *CYP3A5*3*) e *GSTO1* (polimorfismo *GSTO1*A140D*) para as amostras de pacientes com CM e mulheres controles livres desta neoplasia estão apresentadas na Tabela 2.

Em relação ao polimorfismo *CYP3A4*1B*, não foram observados indivíduos homocigotos para o alelo polimórfico (GG), nem heterocigotos (AG) nos dois grupos de estudo. Portanto, 100% das amostras estudadas possuem genótipo AA, sendo a freqüência do alelo A igual a 1,0. Devido a este resultado, o polimorfismo *CYP3A4*1B* não foi submetido à análise estatística ou a outras avaliações neste estudo.

Quando foi analisada a freqüência do polimorfismo *CYP3A5*3*, foi observado que o genótipo homocigoto polimórfico (**3*3*) está presente em 9,5% das pacientes com CM e em 5,3% das mulheres saudáveis, o genótipo heterocigoto (**1*3*) em 29,2% das pacientes com CM e em 30,5% das mulheres saudáveis, e o genótipo homocigoto mais freqüente (**1*1*) em 61,3% das amostras das pacientes com CM e em 64,2% das mulheres saudáveis. As freqüências genóticas e alélicas para o polimorfismo *CYP3A5*3* não diferiram significativamente entre os dois grupos de estudo.

Para o polimorfismo *GSTO1*A140D*, foi observado que o genótipo homocigoto polimórfico (AA) está presente em 1,8% das pacientes com CM e em 6,9% das mulheres saudáveis, o genótipo heterocigoto (CA) em 41,7% das pacientes com CM e em 44,9% das mulheres saudáveis, e o genótipo homocigoto mais freqüente (CC) em 56,5% das amostras de pacientes com CM e em 48,2% das amostras das mulheres saudáveis. Foi observada diferença significativa entre os dois grupos de estudo somente em relação ao genótipo homocigoto polimórfico (AA), onde o grupo de mulheres saudáveis apresenta maior freqüência deste genótipo. Não foi observado neste estudo, diferença significativa entre pacientes com CM e mulheres saudáveis quanto á freqüência alélica para este polimorfismo.

Tabela 2: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO* em pacientes com CM e em mulheres saudáveis utilizadas no estudo molecular.



OR: "odds ratio"; *: estatisticamente significativo ;IC: intervalo de confiança; P: seus valores foram calculados pelo Teste Exato de Fisher

4.2.3 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos dos genes *CYP3A5* e *GSTO1* em pacientes com CM de acordo com características anatomopatológicas

Foram realizadas análises com base nos diferentes genótipos para os polimorfismos dos genes *CYP3A5* (Tabela 3) e *GSTO* (Tabela 4) em relação a características determinadas por exames anatomopatológicos com o intuito de verificar se existe alguma distribuição desigual entre estes parâmetros. Esta análise não foi realizada para o gene *CYP3A4* devido à ausência do alelo polimórfico na amostra estudada.

As características tumorais apresentadas nas Tabelas 3 e 4 foram determinadas antes do início do tratamento quimioterápico neoadjuvante em 99 pacientes com CM (docetaxel 75 mg/m² e epirrubicina 50 mg/m², em um único dia; durante 3 ou 4 ciclos, com intervalos de 21 dias).

Com relação à idade, observamos que 56,6% das pacientes com CM estudadas possuíam idade ≤ 50 anos e que 43,4% possuíam idade > 50 anos.

Quanto ao tamanho do tumor, 57,6% das pacientes com CM possuíam tumores maiores que 5 cm e 42,4% possuíam tumores de até 5 cm.

Para o estadió clínico do tumor, foi utilizado o sistema da AJCC (American Joint Committee on Cancer). A maioria das pacientes estudadas possuíam tumores em estadios mais avançados da doença, onde 54,6% eram estadió III (A ou B) e 42,4% eram estadió II (A e B).

O câncer do tipo ductal foi o mais freqüente representando 92,9% dos tumores. Na categoria “outros”, foram incluídos alguns casos de câncer do tipo ductal e/ou lobular quando associados a outros tipos celulares no mesmo tumor.

O grau histológico dos tumores foi baseado na classificação de Scarff, Bloom e Richardson (1957), modificada por Elston e Ellis (1991), que determina o grau de diferenciação das células neoplásicas, considerando formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. O grau II (moderadamente diferenciado) foi o mais comum

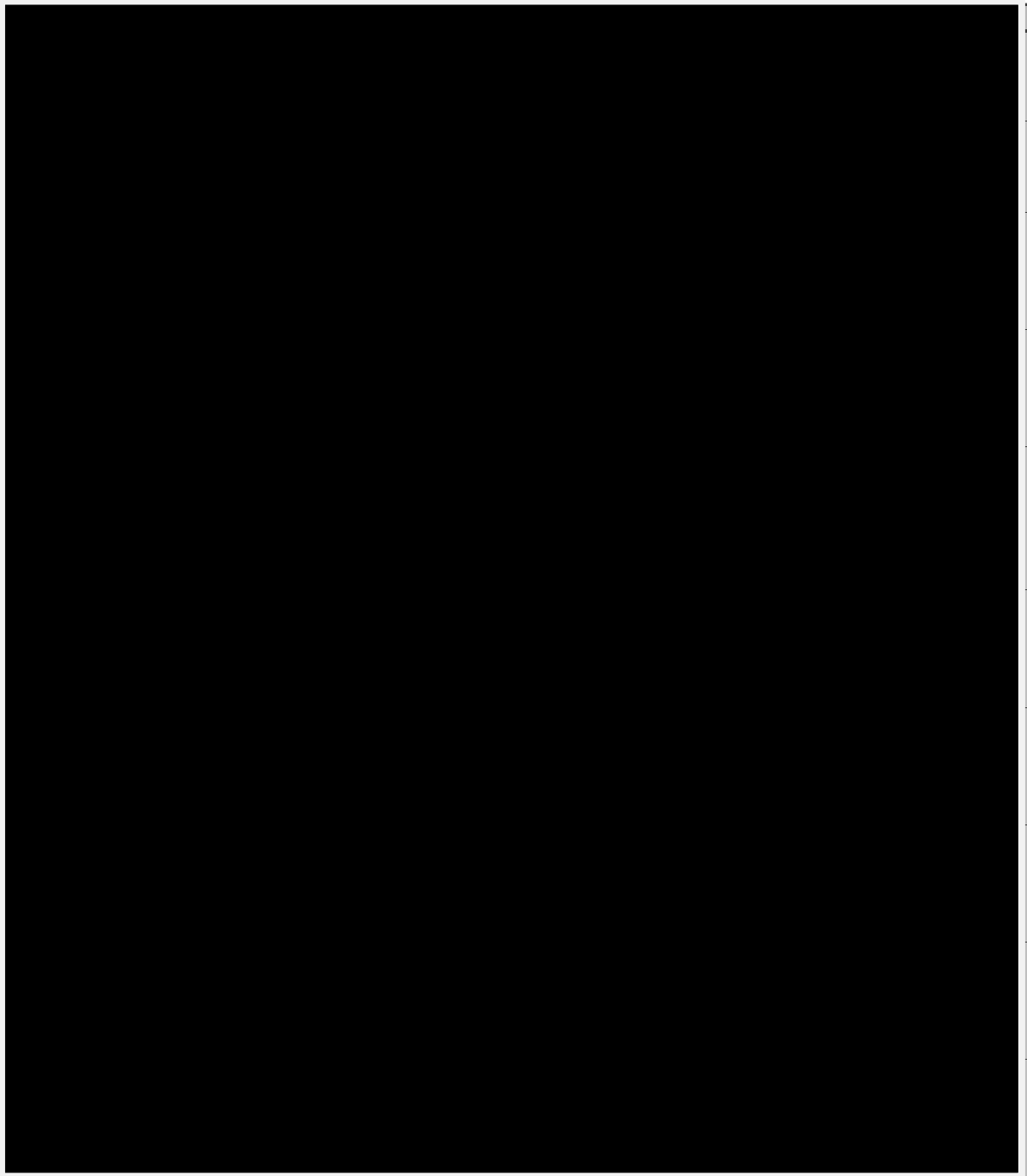
entre as amostras analisadas (46,5%), 15,1% apresentaram grau I (bem diferenciado) e 26,3% grau III (pouco diferenciado), sendo este último considerado o tipo mais agressivo.

Observou-se que a maioria das pacientes com CM (58,6%) estavam em pré-menopausa e que 38,4% em pós-menopausa.

Foi verificado ainda que 62,6% das amostras foram positivas para o receptor de estrógeno e que 47,5% das amostras foram positivas para o receptor de progesterona. Além disso, 29,3% das amostras foram positivas para a expressão da proteína p53 e 22,2% das amostras foram positivas para a expressão da proteína erbB2.

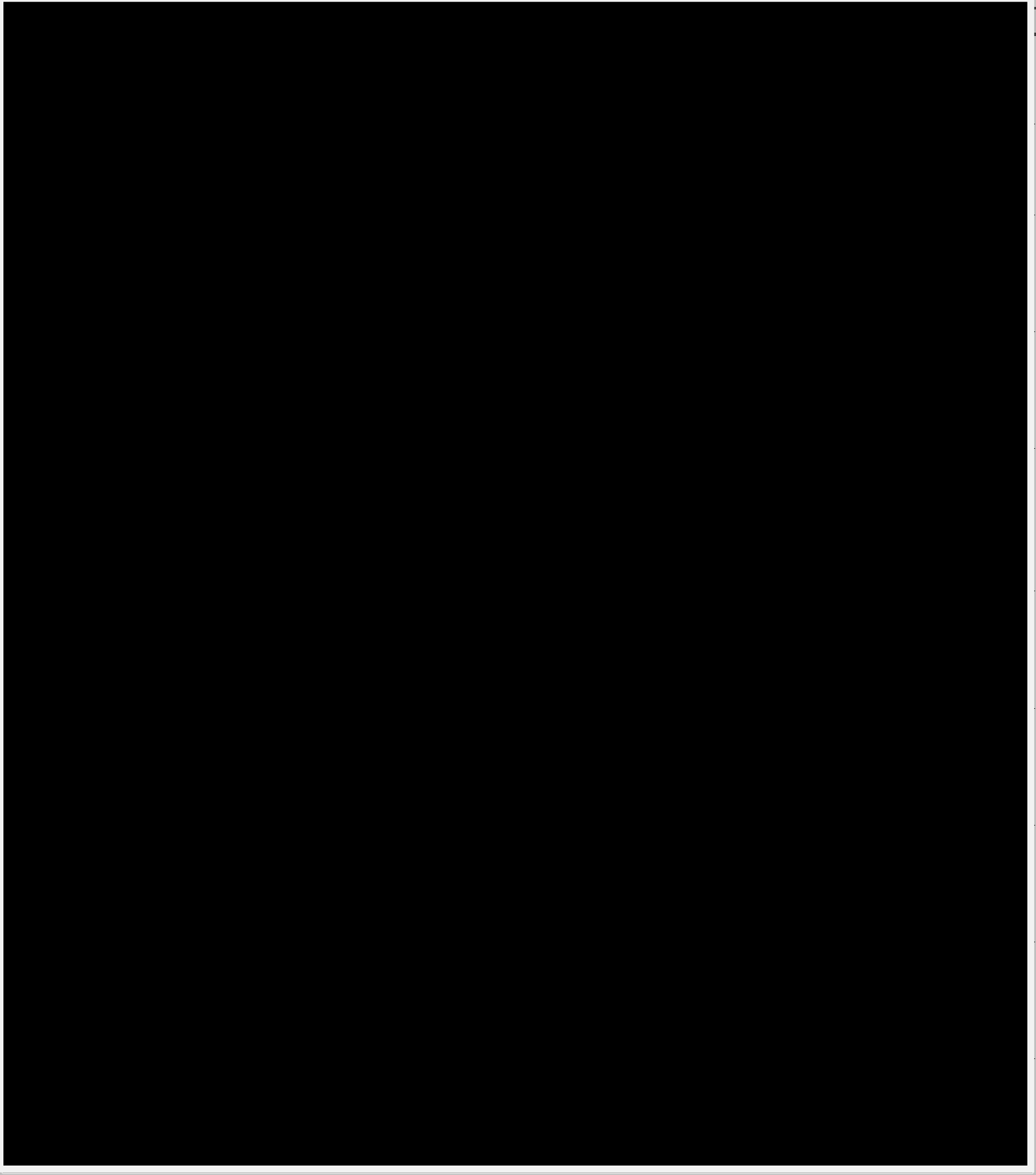
Para todos os parâmetros citados acima, não se observou diferenças significativas em relação aos diferentes genótipos dos polimorfismos dos genes *CYP3A5* e *GSTO*, mostrando que a presença ou ausência dos alelos polimórficos não interfere nas características tumorais nesta amostra de estudo (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Caracterização do grupo de pacientes com CM submetidas à quimioterapia neoadjuvante (n=99), divididas de acordo com os genótipos referentes ao polimorfismo *CYP3A5*3*, quanto às características pré-tratamento informadas em exames anatomopatológicos.



Teste Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher com $\alpha = 0,05$; NI: não informado; NEC: não se encaixa no critério

Tabela 4: Caracterização do grupo de pacientes com CM submetidas à quimioterapia neoadjuvante (n=99), divididas de acordo com os genótipos referentes ao polimorfismo *GSTO1*A140D*, quanto às características pré-tratamento informadas em exames anatomopatológicos.



Teste Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher com $\alpha = 0,05$; NI: não informado; NEC: não se encaixa no critério

4.2.4 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos dos genes *CYP3A5* e *GSTO1* em pacientes com CM de acordo com a resposta patológica após a quimioterapia neoadjuvante

A avaliação da resposta patológica foi baseada no critério WHO (World Health Organization), sendo baseada em exames anatomopatológicos do tumor ou área tumoral remanescente.

Para a análise estatística, as respostas foram agrupadas nas seguintes categorias: doença residual extensa (DRE), que compreende as mulheres com doença progressiva e doença estável, doença residual mínima (DRM), que compreende as mulheres com resposta patológica parcial, e resposta patológica completa (RPC). As classes DRM e RPC foram agrupadas para a análise estatística, uma vez que são consideradas como bons respondedores (Tabela 5).

Observou-se que a maioria das pacientes com CM (72,7%) apresentaram DRM ou RPC e que 27,3% apresentaram DRE.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos DRE em relação à DRM+RPC para os diferentes genótipos estudados (Tabela 5).

Tabela 5: Relação entre os polimorfismos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO* e a resposta patológica das pacientes com CM (n=99) após a quimioterapia neoadjuvante.



DRE: Doença Residual Extensa (doença progressiva + doença estável)

DRM: Doença Residual Mínima (resposta patológica parcial)

RPC: Resposta Patológica Completa.

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

4.3 Análise citogenética: Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa

São apresentados a seguir, os dados referentes ao estudo citogenético realizado em 20 pacientes com CM submetidas a quimioterapia neoadjuvante, e 40 mulheres saudáveis.

Todas as avaliações que envolveram o grupo de mulheres saudáveis foram feitas em comparação com a amostra de pacientes com CM coletada antes de se iniciar o tratamento quimioterápico (amostra 0Q).

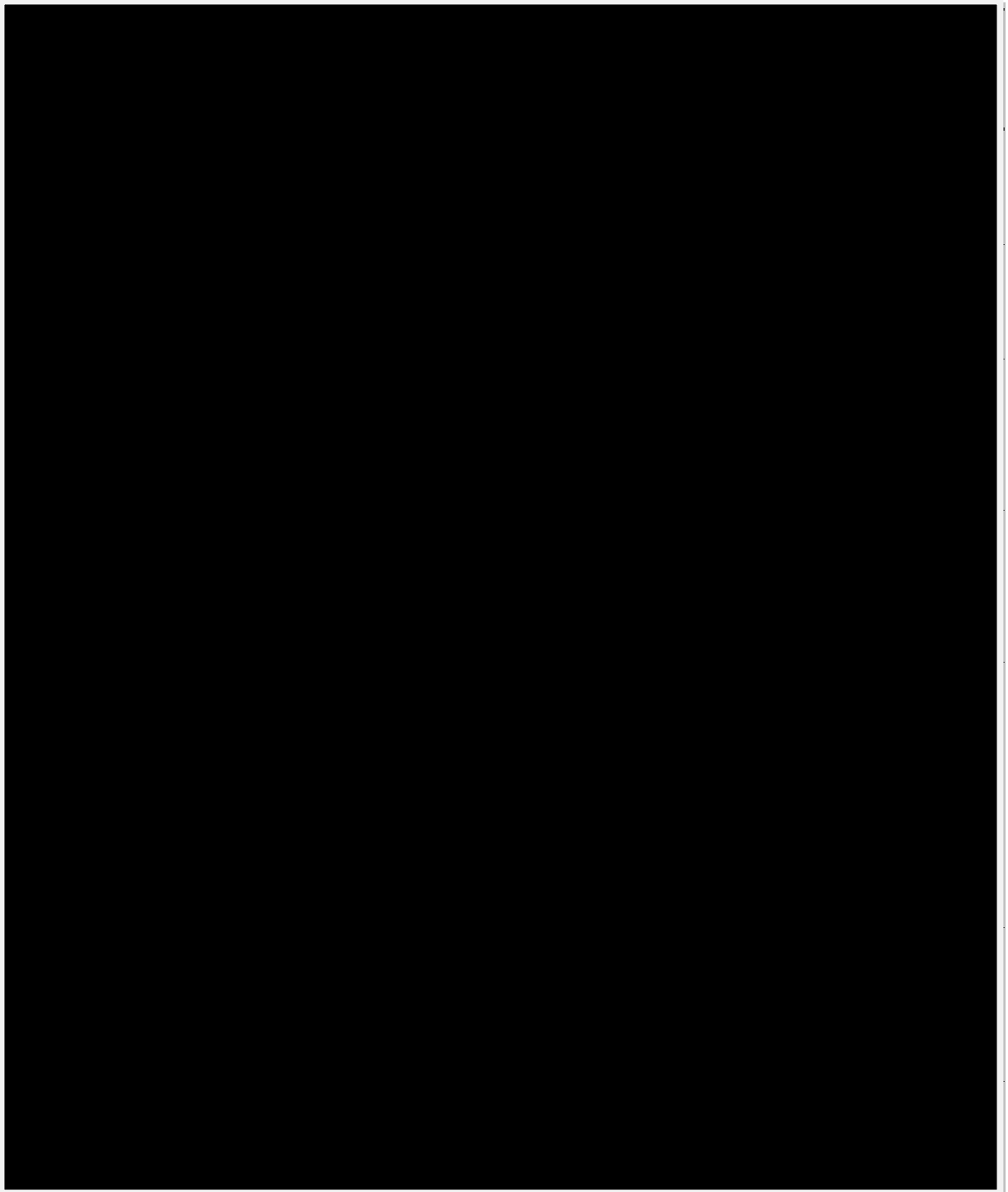
4.3.1 Caracterização geral da amostra de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na avaliação citogenética

A caracterização da amostra populacional quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca e da menopausa, uso de hormônios (contraceptivos ou terapia de reposição hormonal), número de gestações e histórico familiar de câncer está apresentada na Tabela 6.

Foi verificado que a maioria das participantes deste estudo, tanto no grupo de pacientes com CM quanto no grupo de mulheres saudáveis, são não-fumantes, tiveram sua primeira menstruação antes dos 13 anos de idade, estavam em condição de pré-menopausa, fizeram uso de anticoncepcionais e tiveram sua primeira gestação até os 30 anos de idade.

Para todos os parâmetros analisados na Tabela 6, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de estudo.

Tabela 6: Caracterização do grupo de pacientes com CM e do grupo de mulheres saudáveis quanto à idade, hábito tabagista, idade da menarca, idade da menopausa, uso de hormônios, idade da primeira gestação e histórico familiar de câncer, avaliadas no Teste do MN, Índice de Divisão Nuclear e Ensaio Cometa.



Teste Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher com $\alpha = 0,05$; NI: não informado; NEC: não se encaixa no critério.

4.3.2 Distribuição dos genótipos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO1* em pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas também na avaliação citogenética

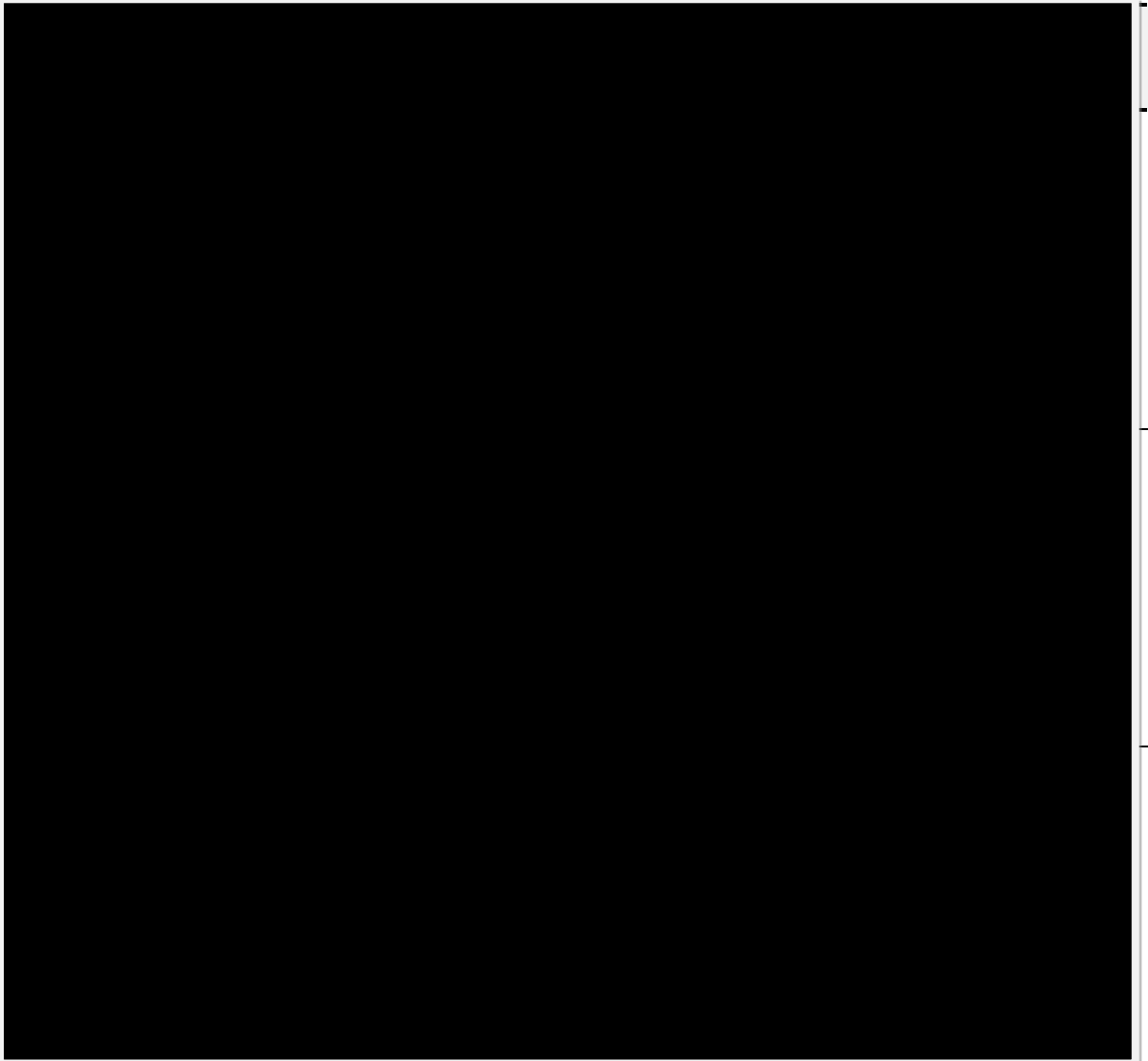
A distribuição das frequências genóticas e alélicas para os genes *CYP3A4* (polimorfismo *CYP3A4*1B*), *CYP3A5* (polimorfismo *CYP3A5*3*) e *GSTO* (polimorfismo *GSTO1*A140D*) para as amostras de pacientes com CM e mulheres saudáveis utilizadas na avaliação citogenética estão apresentadas na Tabela 7.

Assim como na amostra total utilizada neste trabalho (355 indivíduos), na avaliação citogenética (60 indivíduos) também não foram observados indivíduos homocigotos polimórficos (GG) nem heterocigotos (AG) para o polimorfismo *CYP3A4*1B*, indicando frequência alélica igual a 1,0 para o alelo A.

Quanto ao polimorfismo *CYP3A5*3*, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos de estudo tanto em relação às frequências genóticas quanto alélicas.

Para o polimorfismo *GSTO1*A140D*, foi observada diferença significativa para a presença do alelo polimórfico (em heterocigose ou homocigose) ($P= 0,05$) assim como na distribuição alélica, onde o grupo de mulheres saudáveis possui o alelo polimórfico em maior frequência ($P= 0,01$).

Tabela 7: Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO* em pacientes com CM e em mulheres saudáveis utilizadas na avaliação citogenética.



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

4.3.3 Teste do MN

No Teste do MN foi observado que, tanto em pacientes com CM quanto em mulheres saudáveis, existe diferença significativa entre os tratamentos controle negativo e controle de solvente quando comparados com os outros tipos de tratamento (docetaxel, epirubicina e docetaxel + epirubicina) (Tabela 8).

Quando comparamos o grupo de mulheres saudáveis com o grupo de pacientes com CM para o mesmo tipo de tratamento, observamos que não existe diferença significativa apenas para o tratamento com docetaxel (Tabela 8). As diferenças observadas se devem aos valores significativamente maiores para frequência de MNs ocorridos no grupo de pacientes com CM.

A Tabela 9 mostra as frequências de MNs observadas nas amostras de pacientes coletadas durante o tratamento quimioterápico, onde se pode avaliar a indução de danos somente nas três primeiras coletas (0Q, 1Q e 2Q) no Teste do MN devido à ausência de células binucleadas na última amostra coletada (3Q).

A análise estatística das amostras de quimioterapia revela que, assim como na primeira amostra coletada (0Q), nas outras amostras (1Q e 2Q) também houve diferença significativa na frequência de MNs entre os tratamentos controle negativo e controle de solvente em comparação com todos os outros tratamentos (Tabela 9). Ainda com relação a estas amostras, foi verificado que existe, de forma geral, diferença significativa na frequência de MNs quando comparamos 0Q com 1Q, e quando comparamos 1Q com 2Q, com aumento progressivo da frequência de MNs.

Tabela 8: Freqüências médias MNs observadas em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles. Foram analisadas 1000 células binucleadas/tratamento/indivíduo.



Teste Mann-Whitney com $\alpha = 0,05$

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo dentro do mesmo grupo de estudo

Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação com o grupo de mulheres saudáveis

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

Tabela 9: Freqüências médias de MNs observadas em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) nas amostras coletadas antes e durante o tratamento quimioterápico, submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles. Foram analisadas 1000 células binucleadas/tratamento/indivíduo.



Teste Mann-Whitney com $\alpha = 0,05$

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo na mesma coleta

Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação à coleta anterior

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

0Q: coleta realizada antes de iniciar a quimioterapia

1Q e 2Q: coletas realizadas após a primeira e segunda sessões de quimioterapia, respectivamente

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos no Teste do MN quando divididas as pacientes com CM e as mulheres saudáveis de acordo com duas faixas etárias (≤ 45 anos e > 45 anos).

Analisando os dois grupos de estudo separadamente, comparando as duas faixas etárias, foi verificado que o aumento da idade interfere somente no grupo de mulheres saudáveis, onde mulheres acima de 45 anos possuem a frequência de MNs significativamente maior do que mulheres com idade até 45 anos para os tratamentos controle negativo ($P=0,01$) e controle de solvente ($P=0,008$) (Tabela 10).

Ainda na análise em função da idade, foi verificado que existe diferença entre pacientes e mulheres saudáveis quando estas são comparadas dentro da mesma faixa etária (tanto ≤ 45 anos quanto > 45 anos) para os tratamentos controle negativo ($P=0,0001$ e $P=0,04$) e de solvente ($P=0,0001$ e $P=0,04$) (Tabela 10).

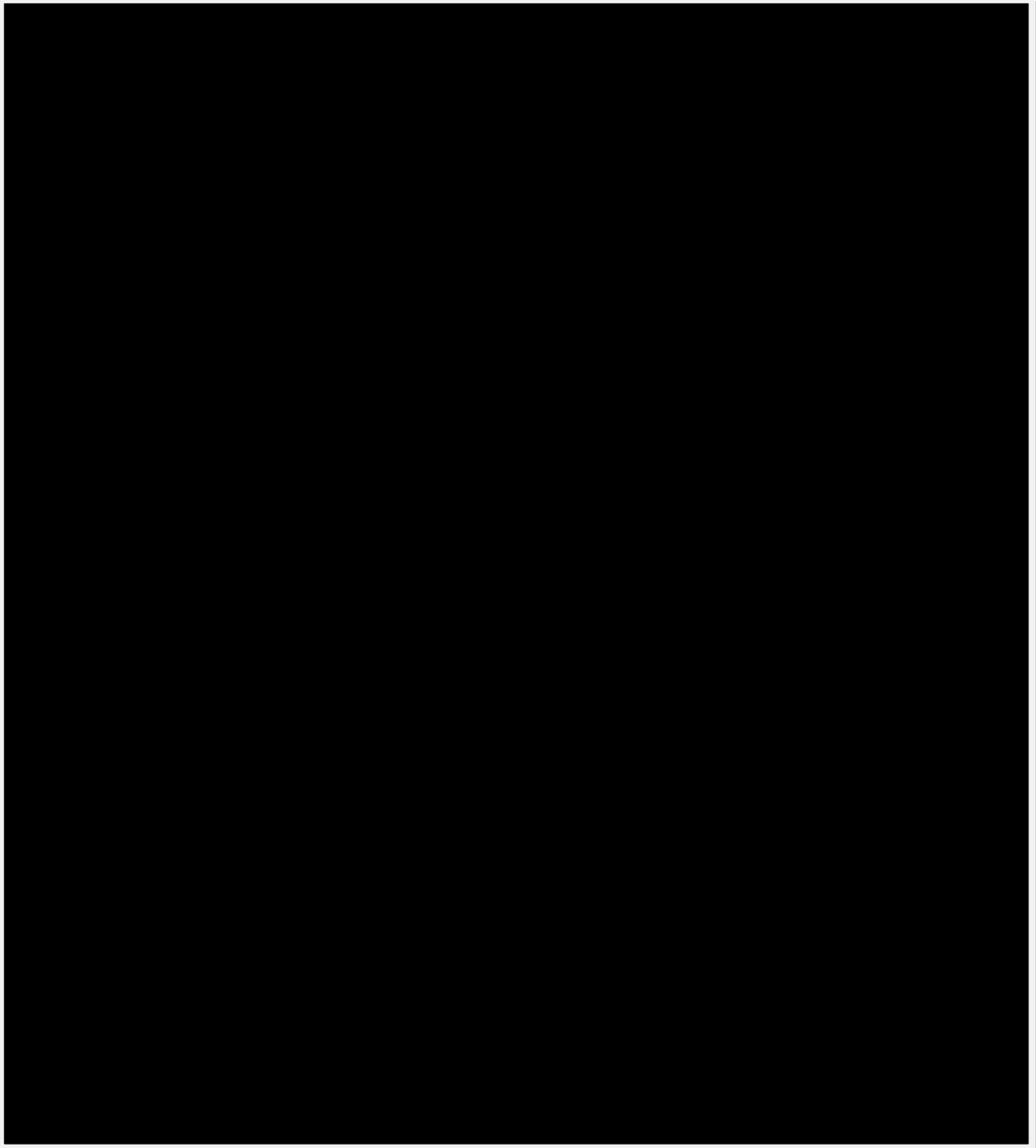
Além disso, pacientes com mais de 45 anos se mostraram mais sensíveis à indução de danos pelos tratamentos docetaxel ($P=0,03$) e docetaxel + epirubicina ($P=0,01$) quando comparadas com mulheres saudáveis na mesma faixa etária, indicando aumento de sensibilidade com o aumento da idade (Tabela 10).

Também foi feita a análise da frequência de MNs em relação ao hábito tabagista (Tabela 11). Foi verificado que, quando analisados os grupos de estudo separadamente, o hábito de fumar torna somente o grupo de pacientes com CM mais suscetível aos danos induzidos pelos tratamentos com docetaxel ($P=0,03$) e docetaxel + epirubicina ($P=0,04$).

Quanto ao tabagismo ainda, quando comparamos os dois grupos de estudo para o mesmo hábito, verificamos que pacientes com CM fumantes apresentam frequência de MNs significativamente maior do que mulheres saudáveis fumantes para os tratamentos com docetaxel ($P=0,008$), epirubicina ($P=0,05$) e docetaxel + epirubicina ($P=0,04$). Além disso, quanto ao hábito de não fumar, o grupo de pacientes com CM mostrou diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo de mulheres saudáveis para os

tratamentos controle negativo ($P=0,0001$), controle de solvente ($P=0,0001$) e epirubicina ($P=0,03$) (Tabela 11).

Tabela 10: Frequências médias de MNs observadas em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos em relação à idade (≤ 45 anos e > 45 anos). Foram analisadas 1000 células binucleadas/tratamento/indivíduo.

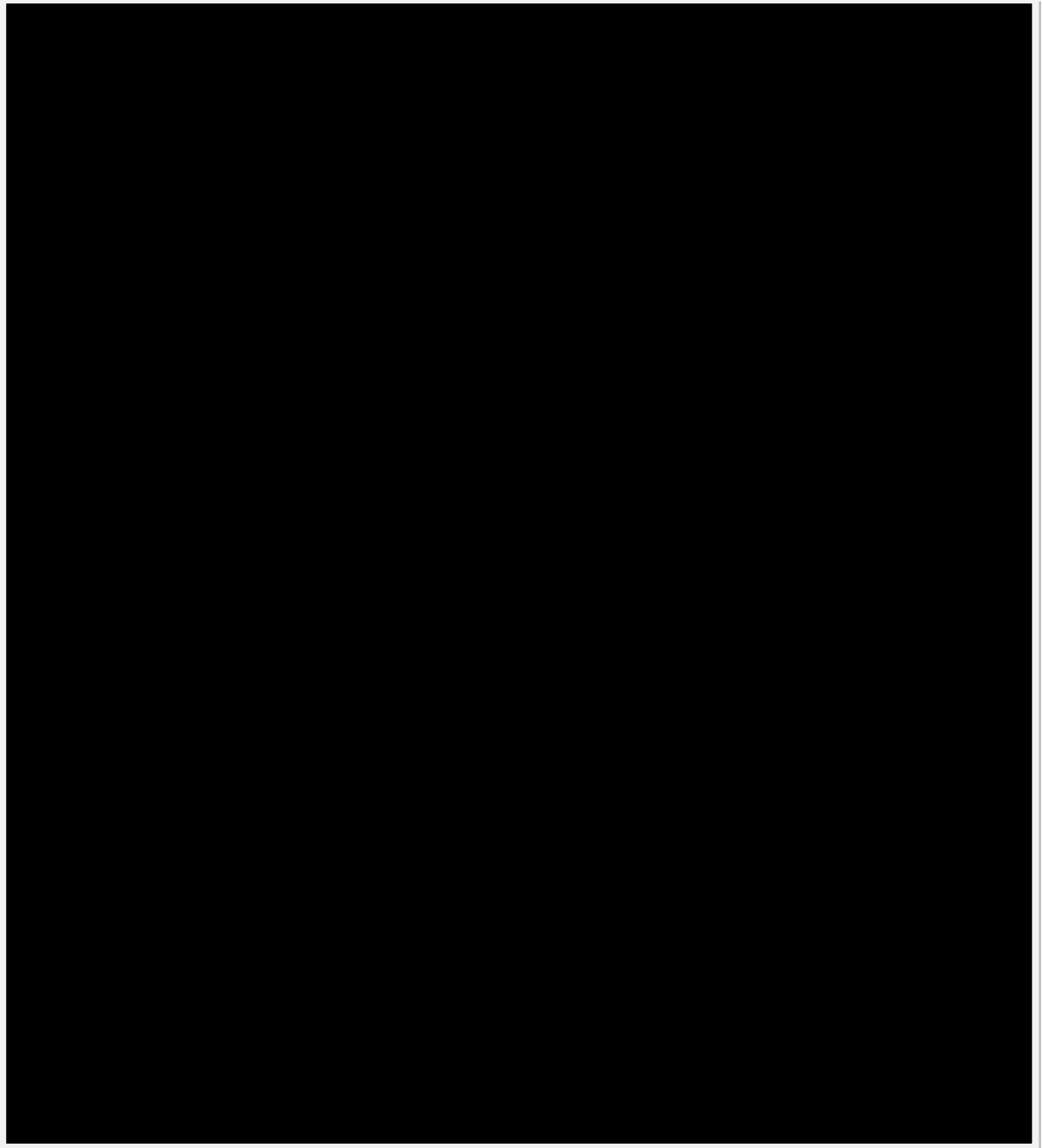


* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

Tabela 11: Freqüências médias de MNs observadas em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, de acordo com o hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células binucleadas/tratamento/indivíduo.



* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

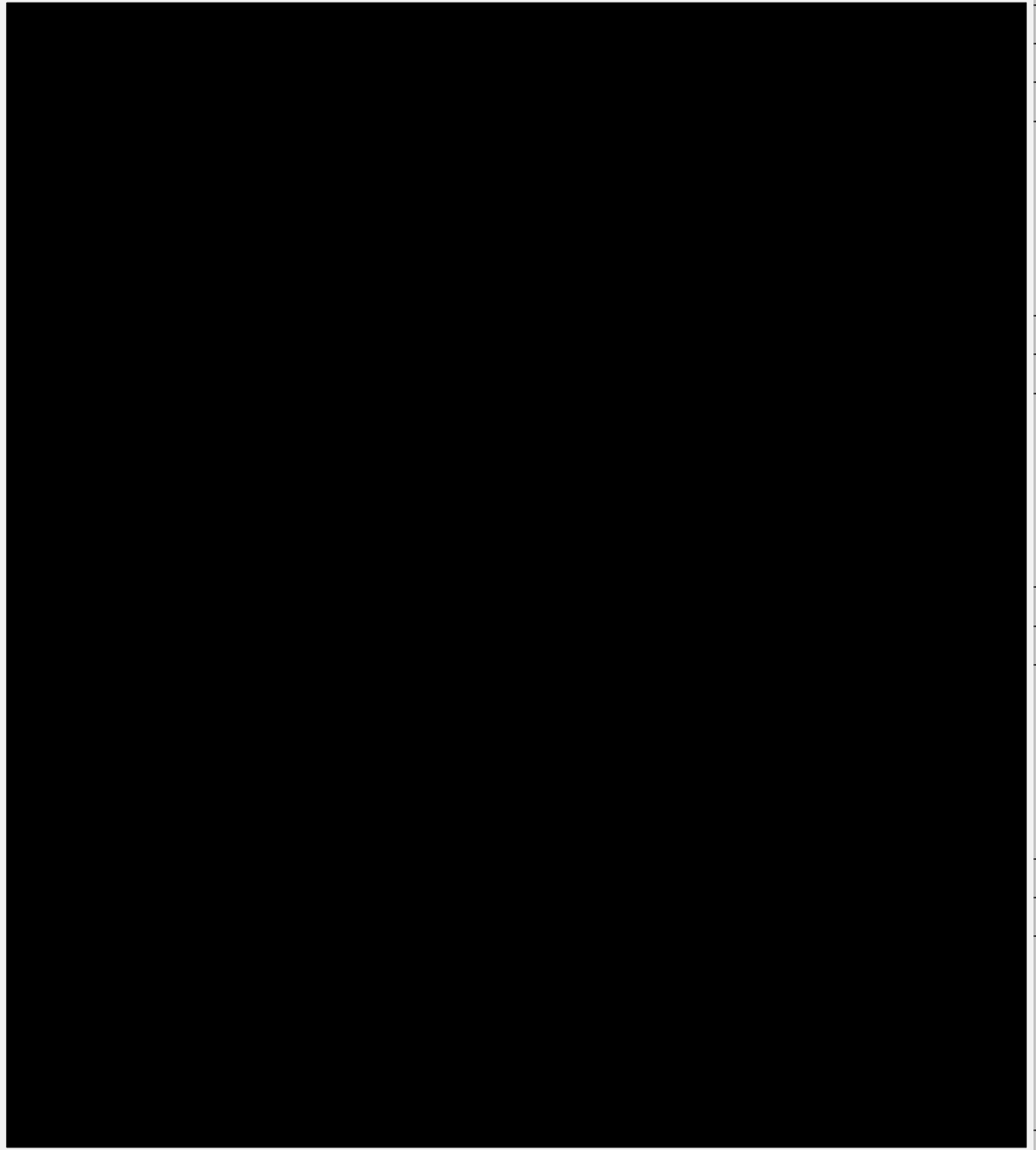
Com o intuito de se verificar se existe influência do genótipo na indução de danos no DNA, os resultados de MN também foram fragmentados de acordo com a ausência ou presença dos alelos polimórficos para os genes *CYP3A5* e *GSTO* (para *CYP3A4* não foi realizada esta análise em função da ausência do alelo polimórfico na amostra de estudo).

Com relação aos diferentes genótipos para o polimorfismo do gene *CYP3A5*, existe diferença significativa dentro do grupo de pacientes para o tratamento com epirubicina ($P=0,02$), onde a presença do alelo polimórfico ($*1*3 + *3*3$) reduziu significativamente a frequência de MNs (Tabela 12).

As diferenças significativas entre pacientes com CM e mulheres saudáveis se mantiveram tanto na ausência ($*1*1$) quanto na presença ($*1*3 + *3*3$) do alelo polimórfico para o gene *CYP3A5* nos tratamentos controle negativo ($P=0,0001$ e $P=0,02$) e controle de solvente ($P=0,0001$ e $P=0,01$) (Tabela 12).

Com relação ao polimorfismo do gene *CYP3A5* estudado, embora não exista diferença estatisticamente significativa, destacamos o fato de que quando comparamos os diferentes genótipos, a presença ($*1*3 + *3*3$) do alelo polimórfico acarreta em uma diminuição da frequência de MNs em ambos os grupos de estudo (Tabela 12).

Tabela 12: Freqüências médias de MNs observadas em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos de acordo com a ausência (*1*1) ou presença (*1*3 + *3*3) do alelo polimórfico para o gene *CYP3A5*. Foram analisadas 1000 células binucleadas/tratamento/indivíduo.



* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação ao outro grupo de estudo

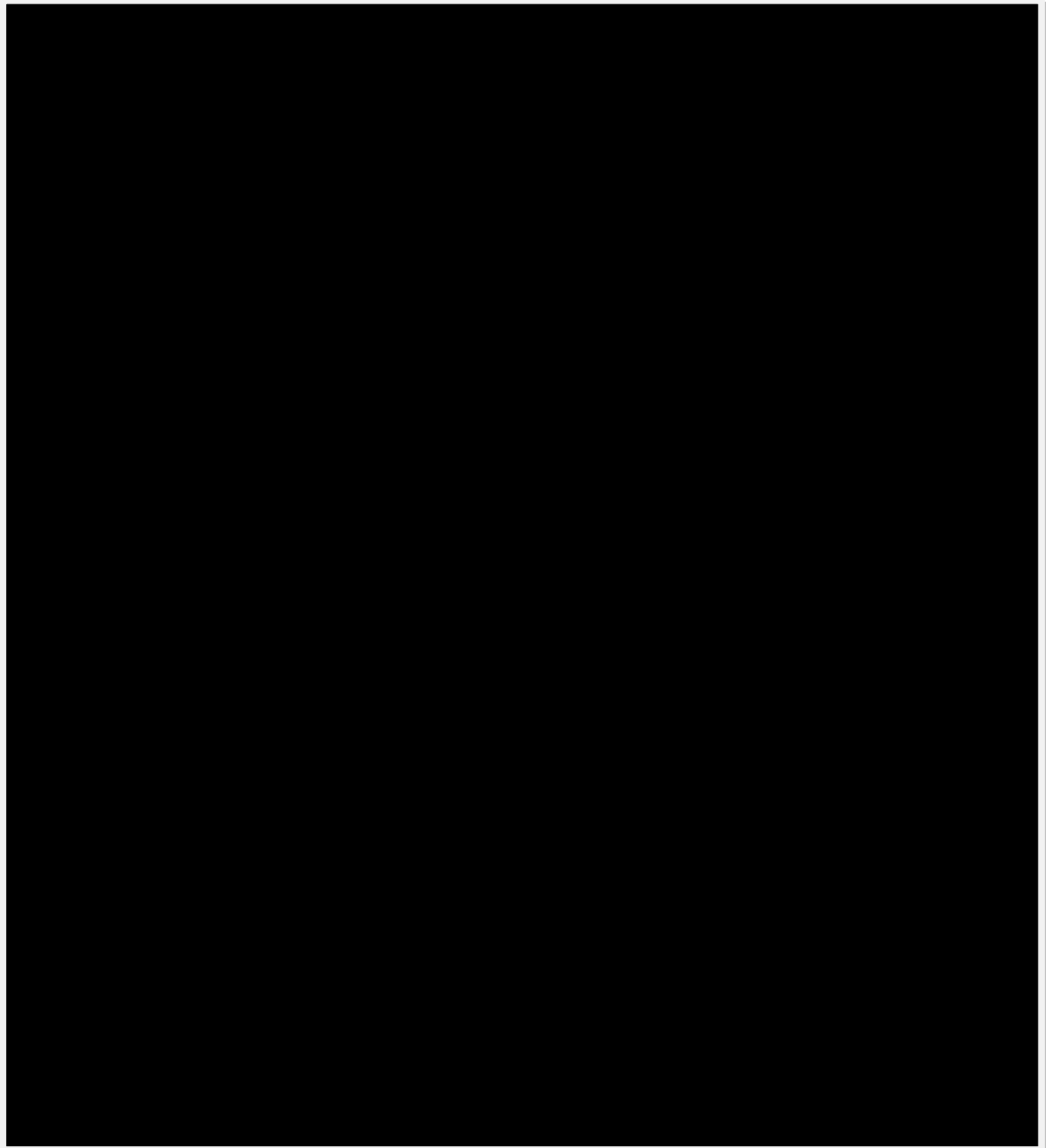
X ± DP: Média ± Desvio Padrão

Em relação aos diferentes genótipos para o polimorfismo do gene *GSTO*, existe diferença significativa dentro do grupo de mulheres saudáveis somente para o tratamento com docetaxel + epirubicina ($P=0,05$), indicando que a presença do alelo polimórfico (CA + AA), associada tratamento, aumenta significativamente a frequência de MNs (Tabela 13).

As diferenças entre pacientes com CM e mulheres saudáveis se mantiveram na ausência (CC) do alelo polimórfico para o gene *GSTO* em todos os tipos tratamentos, se observando em todos os casos uma maior frequência de MNs no grupo de pacientes (Tabela 13). A mesma diferença entre os dois grupos de estudo também foi observada na presença (CA + AA) do alelo polimórfico para os tratamentos controle negativo ($P=0,007$) e controle de solvente ($P=0,005$) (Tabela 13).

Quanto ao polimorfismo do gene *GSTO* estudado, embora não exista diferença estatisticamente significativa, destacamos o fato de que quando comparamos os diferentes genótipos, a presença (CA + AA) do alelo polimórfico acarreta em um aumento da frequência de MNs em mulheres saudáveis para todos os tipos de tratamentos e em pacientes com CM somente para os tratamentos docetaxel e docetaxel + epirubicina (Tabela 13).

Tabela 13: Freqüências médias de MNs observadas em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos de acordo com a ausência (CC) ou presença (CA + AA) do alelo polimórfico para o gene *GSTO*. Foram analisadas 1000 células binucleadas/tratamento/indivíduo.



* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

Também foi feita a análise da frequência de MNs em relação à resposta patológica das pacientes com CM nas amostras coletadas durante o tratamento quimioterápico (Tabela 14). Foi observado que existe diferença significativa entre pacientes com DRE e pacientes com DRM+RPC apenas em 1Q para os tratamentos controle negativo e controle de solvente. Analisando somente as pacientes com DRE, foi verificada diferença significativa somente para os tratamentos controle negativo, controle de solvente e epirubicina quando comparamos 0Q e 1Q. Analisando somente as pacientes com DRM+RPC, foi verificada diferença significativa para todos os tipos de tratamentos quando comparamos 0Q e 1Q. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, podemos observar que pacientes com DRM+RPC apresentaram frequências de MNs maiores do que pacientes com DRE em todas as amostras coletadas.

Tabela 14: Freqüências médias de MNs observadas em cultura de linfócitos do sangue periférico humano de pacientes com CM (20 indivíduos) nas amostras coletadas antes e durante o tratamento quimioterápico, submetidas a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididas de acordo com a resposta patológica. Foram analisadas 1000 células binucleadas/tratamento/indivíduo.



† teste Mann-Whitney com $\alpha = 0,05$

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

0Q: coleta realizada antes de iniciar a quimioterapia

1Q e 2Q: coletas realizadas após a primeira e segunda sessões de quimioterapia, respectivamente

DRE: Doença Residual Extensa (doença progressiva + doença estável)

DRM: Doença Residual Mínima (resposta patológica parcial)

RPC: Resposta Patológica Completa

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo na mesma amostra

Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação à DRE em 1Q

φ Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação a 0Q

4.3.4 Índice de Divisão Nuclear (IDN)

Foi observado, quanto ao IDN, que no grupo de mulheres saudáveis existe diferença significativa entre o tratamento controle negativo e os tratamentos com docetaxel e docetaxel + epirubicina. No grupo de pacientes com CM, foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o tratamento controle negativo e os tratamentos com docetaxel, epirubicina e docetaxel + epirubicina. Quando se comparou pacientes com CM e mulheres saudáveis para o mesmo tipo de tratamento, foi verificada diferença significativa em todos os tipos de tratamentos testados, destacando o fato do grupo de pacientes com CM apresentar os menores valores de IDN para todos os tratamentos utilizados (Tabela 15).

Em relação às amostras de pacientes coletadas durante a quimioterapia (Tabela 16), destacamos o fato de que a partir da quarta amostra coletada (3Q), foram observadas somente células mononucleadas nas lâminas, o que impediu a determinação do IDN nesta amostra.

A análise estatística das três primeiras amostras coletadas (0Q, 1Q e 2Q), mostra que, de forma geral, há diferença significativa quanto ao IDN entre as coletas, para todos os tipos de tratamentos, com progressiva redução deste ao longo das coletas (Tabela 16).

Analisando separadamente os dois grupos de estudo de acordo com faixas etárias (≤ 45 anos e > 45 anos), verificamos que tanto mulheres saudáveis como pacientes com CM não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos utilizados (Tabela 17).

Comparando os dois grupos de estudo na faixa etária ≤ 45 anos, verificamos diferença significativa para todos os tipos de tratamentos, exceto epirubicina. Já na comparação para a faixa etária > 45 anos, foi observada diferença significativa para os tratamentos com docetaxel ($P=0,03$) e docetaxel + epirubicina ($P=0,01$) (Tabela 17).

Tabela 15: Índices de Divisão Nuclear (IDN) médios observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) submetidos, *in vitro*, a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina, e seus respectivos controles. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.



teste mann-whitney com $\alpha = 0,05$

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação com o grupo de mulheres saudáveis

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

Tabela 16: Índices de Divisão Nuclear (IDN) médios observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) nas amostras coletadas antes e durante o tratamento quimioterápico submetidos, *in vitro*, a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles. Foram analisadas 1000 células/tratamento/indivíduo.



teste mann-whitney com $\alpha = 0,05$

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

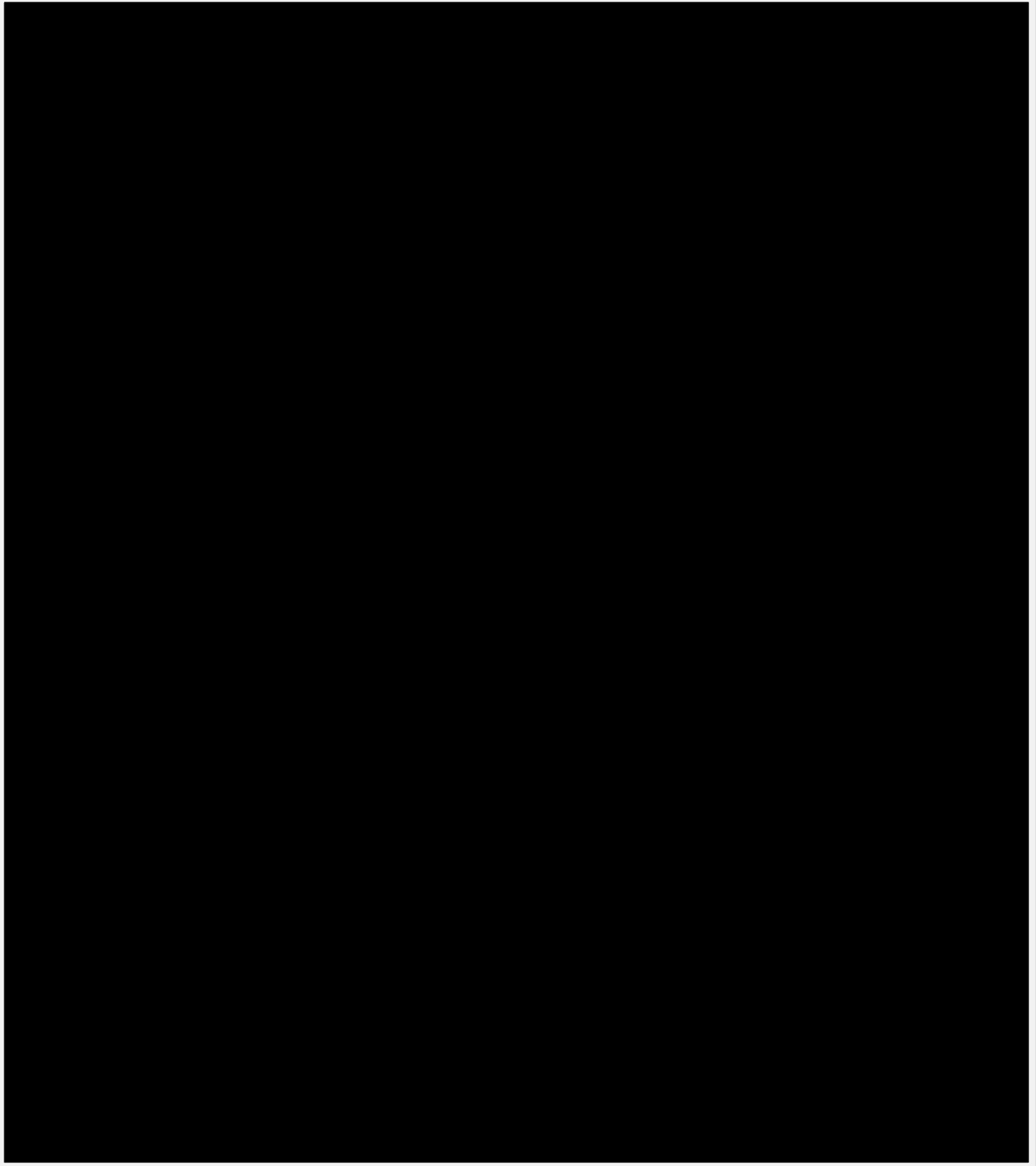
Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação à coleta anterior

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

0Q: coleta realizada antes de iniciar a quimioterapia

1Q, 2Q: coletas realizadas após a primeira e segunda sessões de quimioterapia, respectivamente

Tabela 17: Índices de Divisão Nuclear (IDN) médios observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos em relação à idade (≤ 45 anos e > 45 anos). Foram analisadas 1000 células /tratamento/indivíduo.



— Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

A Tabela 18 mostra os valores de IDN observados para mulheres saudáveis e pacientes com CM de acordo com o hábito tabagista. Avaliando os dois grupos de estudo separadamente, verificamos que o hábito de fumar exerceu influência somente no grupo de mulheres saudáveis, com diferença significativa para todos os tipos de tratamentos.

Comparando mulheres saudáveis com pacientes com CM, verificamos diferenças significativas para todos os tipos de tratamentos quanto ao IDN, tanto em não-fumantes como em fumantes (Tabela 18).

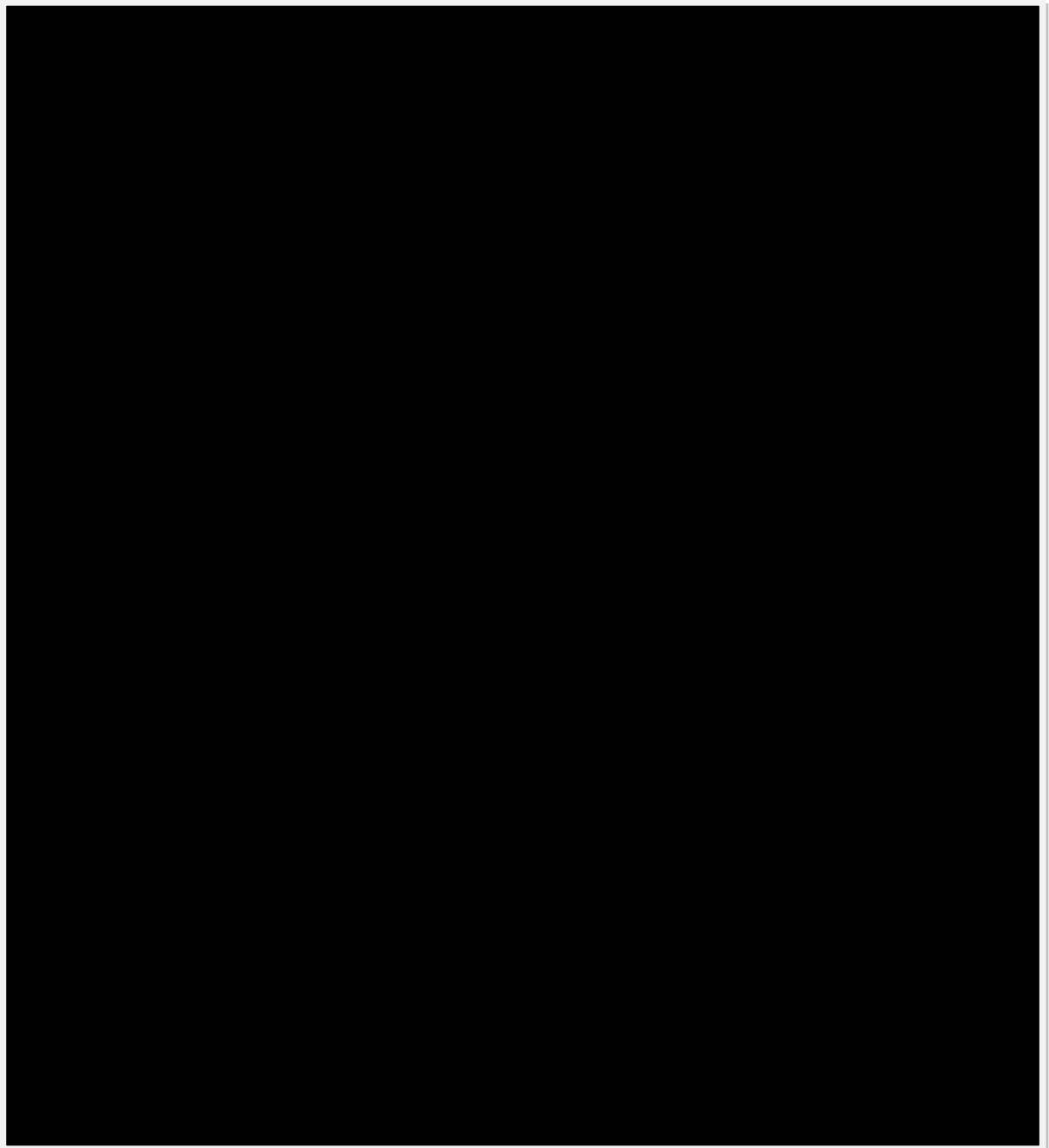
Analisando separadamente mulheres saudáveis e pacientes com CM para os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *CYP3A5* (Tabela 19) e do polimorfismo do gene *GSTO* (Tabela 20), verificamos que a presença do alelo polimórfico não acarreta em mudança significativa no valor do IDN.

Na comparação entre mulheres saudáveis e pacientes com CM para os mesmos genótipos quanto ao polimorfismo do gene *CYP3A5*, observamos que tanto na ausência (*1*1) quanto na presença (*1*3 + *3*3) do alelo polimórfico existe diferença significativa entre os dois grupos de estudo (Tabela 19).

Quanto aos genótipos para o polimorfismo do gene *GSTO*, observamos que, na ausência (CC) do alelo polimórfico, existe diferença significativa entre mulheres saudáveis e pacientes com CM para todos os tipos de tratamentos, e que na presença (CA + AA) do alelo polimórfico, existe diferença significativa somente para o tratamento com docetaxel + epirubicina (Tabela 20).

A Tabela 21 mostra os valores de IDN das amostras de pacientes com CM coletadas durante o tratamento quimioterápico, divididas de acordo com resposta patológica. Podemos observar que somente as pacientes com DRM+RPC apresentaram diferença significativa em seus valores de IDN quando comparamos 0Q com 1Q e quando comparamos 1Q com 2Q para os mesmos tipos de tratamentos.

Tabela 18: Índices de Divisão Nuclear (IDN) médios observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, de acordo com o hábito tabagista. Foram analisadas 1000 células /tratamento/indivíduo.

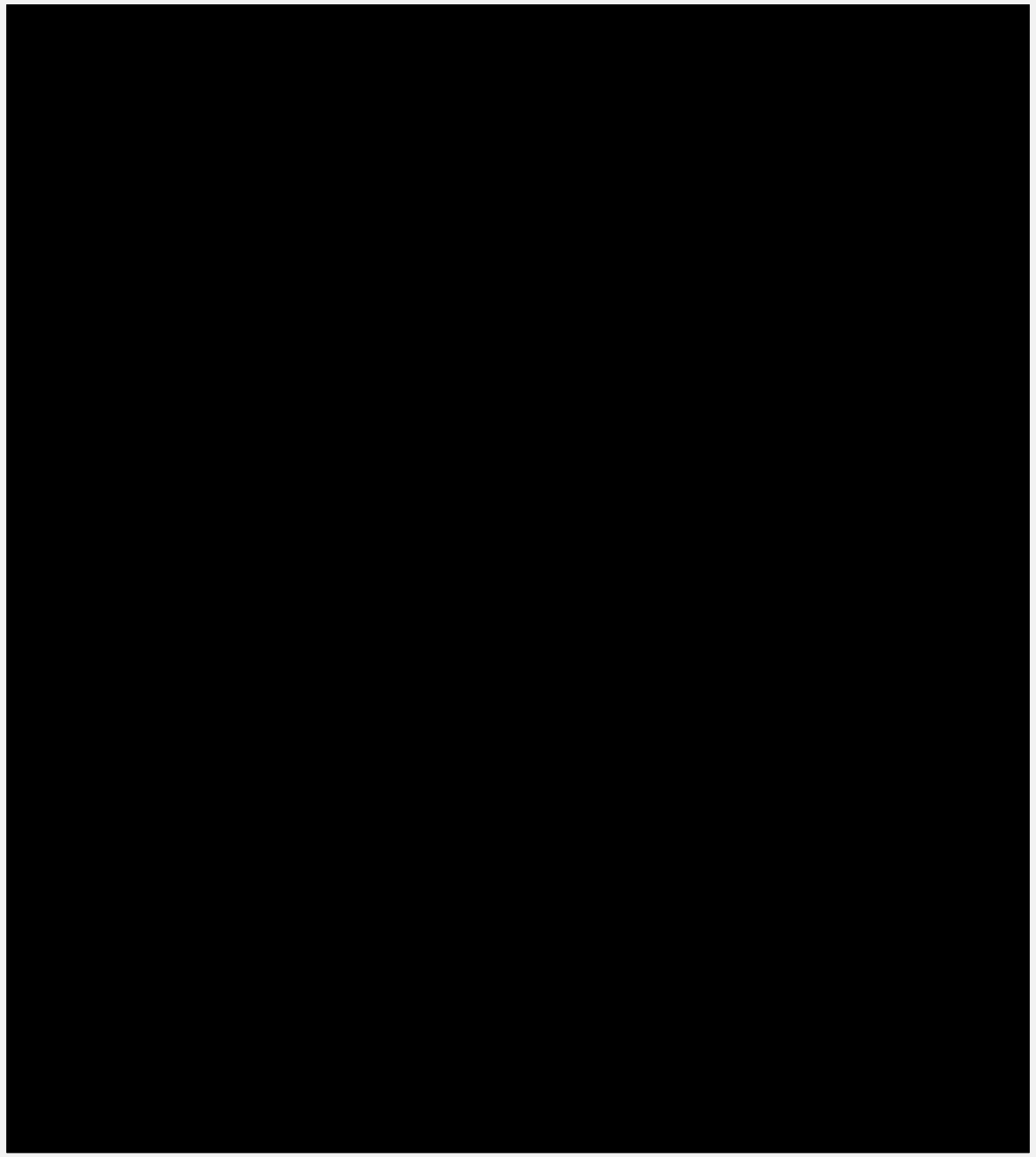


* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

Tabela 19: Índices de Divisão Nuclear (IDN) médios observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos de acordo com a ausência (*1*1) ou presença (*1*3 + *3*3) do alelo polimórfico para o gene *CYP3A5*. Foram analisadas 1000 células /tratamento/indivíduo.

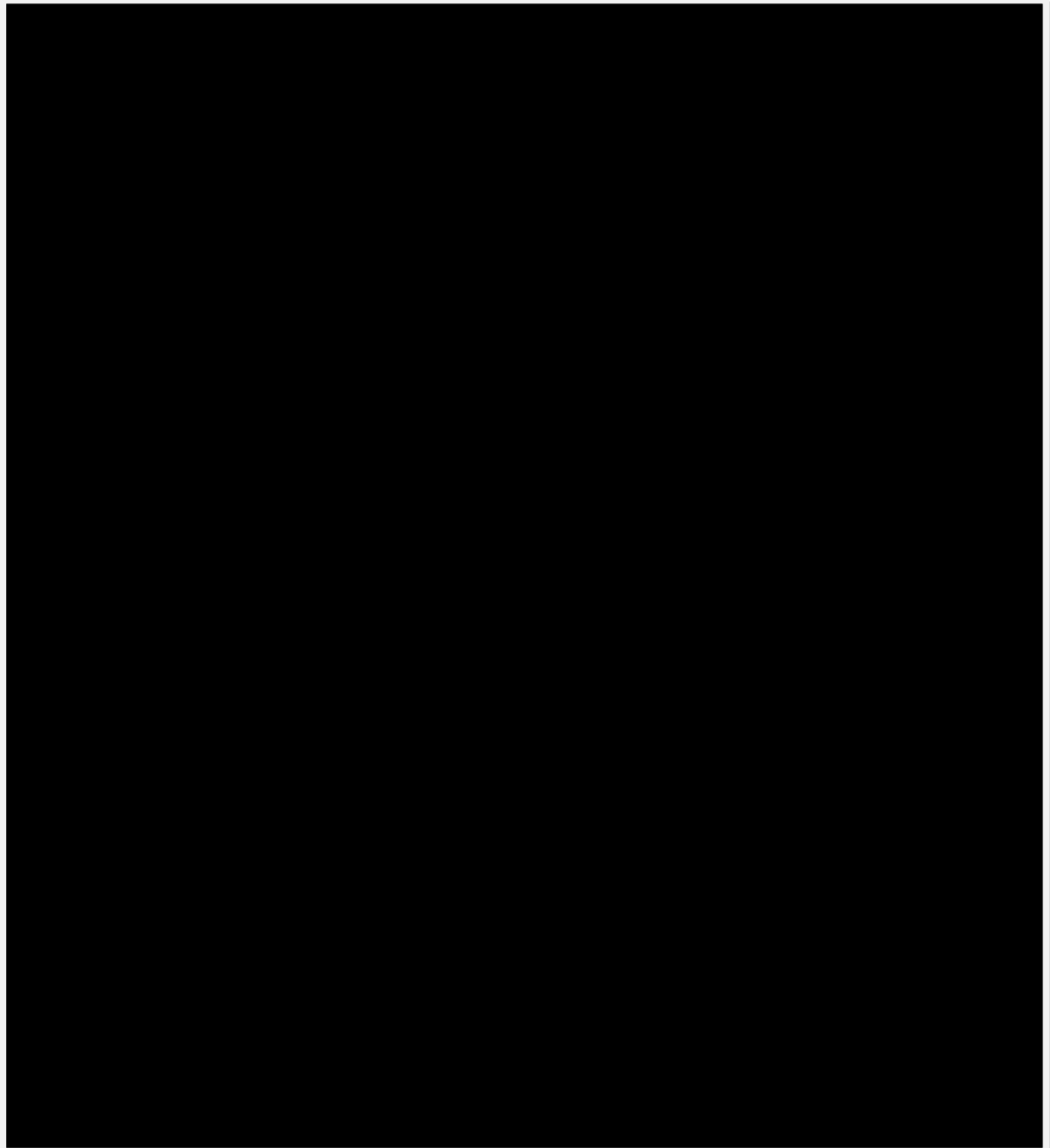


* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

Tabela 20: Índices de Divisão Nuclear (IDN) médios observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos), submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos de acordo com a ausência (CC) ou presença (CA + AA) do alelo polimórfico para o gene *GSTO*. Foram analisadas 1000 células /tratamento/indivíduo.



* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

X ± DP: Média ± Desvio Padrão

Tabela 21: Índices de Divisão Nuclear (IDN) médios observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano de pacientes com CM (20 indivíduos) nas amostras coletadas antes e durante o tratamento quimioterápico, submetidas a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididas de acordo com a resposta patológica. Foram analisadas 1000 células /tratamento/indivíduo.

teste mann-whitney com $\alpha = 0,05$

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

0Q: coleta realizada antes de iniciar a quimioterapia

1Q e 2Q: coletas realizadas após a primeira e segunda sessões de quimioterapia, respectivamente

DRE: Doença Residual Extensa (doença progressiva + doença estável)

DRM: Doença Residual Mínima (resposta patológica parcial)

RPC: Resposta Patológica Completa

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo na mesma amostra

Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação à 0Q

φ Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação à 1Q

4.3.5 Ensaio Cometa

No Ensaio Cometa, não foi observada diferença significativa no escore de dano (ED) em T_0 , tanto na comparação entre os dois grupos (mulheres saudáveis e pacientes com CM) quanto entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo (Tabela 22).

Em T_1 , tanto para pacientes com CM quanto para mulheres saudáveis, foi verificada diferença significativa na comparação entre os tratamentos controle negativo e controle de solvente em relação aos demais grupos de tratamento. Ainda em T_1 , foi verificado que o ED induzido pelos tratamentos com os quimioterápicos não difere significativamente entre os dois grupos, indicando que não houve diferença na indução de dano quando comparamos mulheres saudáveis com pacientes com CM (Tabela 22).

Na comparação do ED entre T_1 e T_2 , em ambos os grupos de estudo, não foi verificada diferença significativa para os tratamentos com os quimioterápicos. Portanto, não houve redução significativa do dano induzido nos linfócitos em T_1 (Tabela 22).

Tabela 22: Escores de Dano (ED) no DNA observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) no Ensaio Cometa, submetidos a tratamentos, *in vitro*, com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles. Foram analisadas 100 células/tratamento/indivíduo em cada tempo (T_0 , T_1 e T_2) do experimento.

Teste Mann-Whitney com $\alpha = 0,05$

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação a T_0

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

Nas amostras de pacientes coletadas durante a quimioterapia (Tabela 23), verificamos que se mantém a diferença significativa entre os tratamentos controle negativo e controle de solvente em relação a todos os tratamentos com os quimioterápicos em T_1 e em T_2 . Quando comparamos T_1 com T_2 , não observamos diferenças para os tratamentos com os quimioterápicos, indicando que não houve redução significativa no ED. Além disso, verificamos que não existe diferença estatisticamente significativa quando comparamos T_1 entre as diferentes coletas (0QT, 1QT, 2QT e 3QT), apesar de se observar um aumento gradativo no ED.

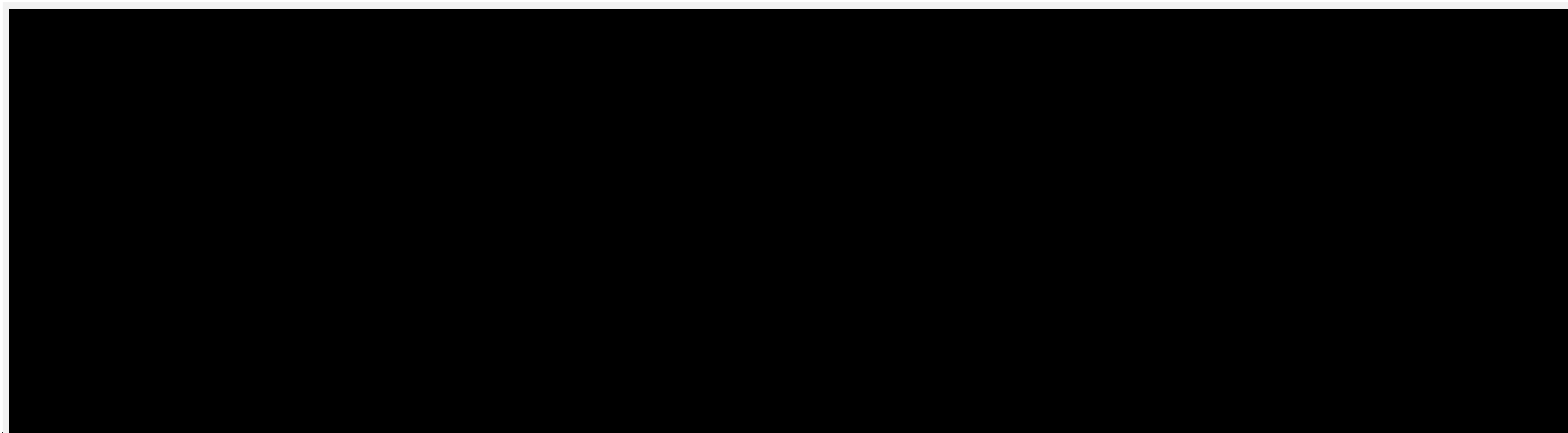
As Tabelas 24 e 25 mostram que não existe influência da idade (≤ 45 anos e >45 anos) e do hábito tabagista (fumante e não-fumante) sobre o ED avaliado no Ensaio Cometa nesta amostra de estudo.

Foi observada diferença significativa entre a ausência (*1*1) e a presença (*1*3 + *3*3) do alelo polimórfico para o gene *CYP3A5* somente no grupo de pacientes com CM, no tratamento docetaxel + epirubicina ($P=0,01$) (Tabela 26). Quando comparadas mulheres saudáveis com pacientes com CM, foi observada diferença significativa somente na presença (*1*3 + *3*3) do alelo polimórfico para o gene *CYP3A5* para os tratamentos controle negativo ($P=0,05$) e de solvente ($P=0,04$) (Tabela 26).

Em relação aos diferentes genótipos para *GSTO*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas comparações realizadas para mulheres saudáveis e pacientes com CM (Tabela 27).

Também foi feita a análise do ED no DNA em relação à resposta patológica das pacientes com CM nas amostras coletadas durante o tratamento quimioterápico. Foi observado que existe diferença significativa entre pacientes com DRE e pacientes com DRM+RPC apenas em 0Q para os tratamentos com os quimioterápicos. Analisando separadamente as pacientes quanto ao tipo de resposta patológica (DRE ou DRM+RPC), não foi observada diferença significativa quando comparamos as amostras (Q) coletadas entre si para os mesmos tipos de tratamentos (Tabela 28).

Tabela 23: Escores de Dano (ED) no DNA observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) nas amostras coletadas antes e durante o tratamento quimioterápico, submetidos, *in vitro*, a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles. Foram analisadas 100 células/tratamento/indivíduo em cada tempo (T_0 , T_1 e T_2) do experimento.



Teste Mann-Whitney com $\alpha = 0,05$

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

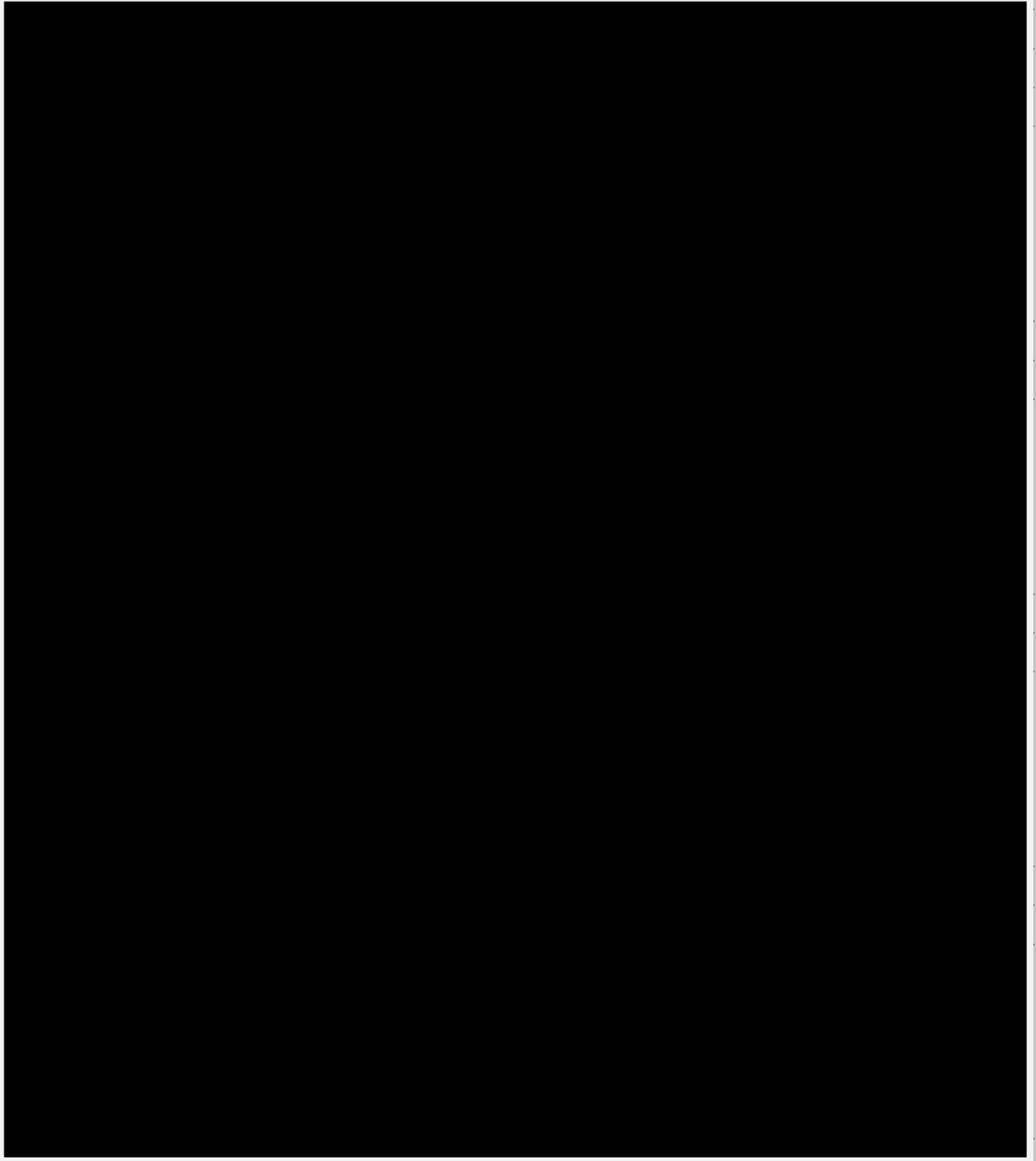
Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação à T_0 na mesma coleta (Q)

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

0Q: coleta realizada antes de iniciar a quimioterapia

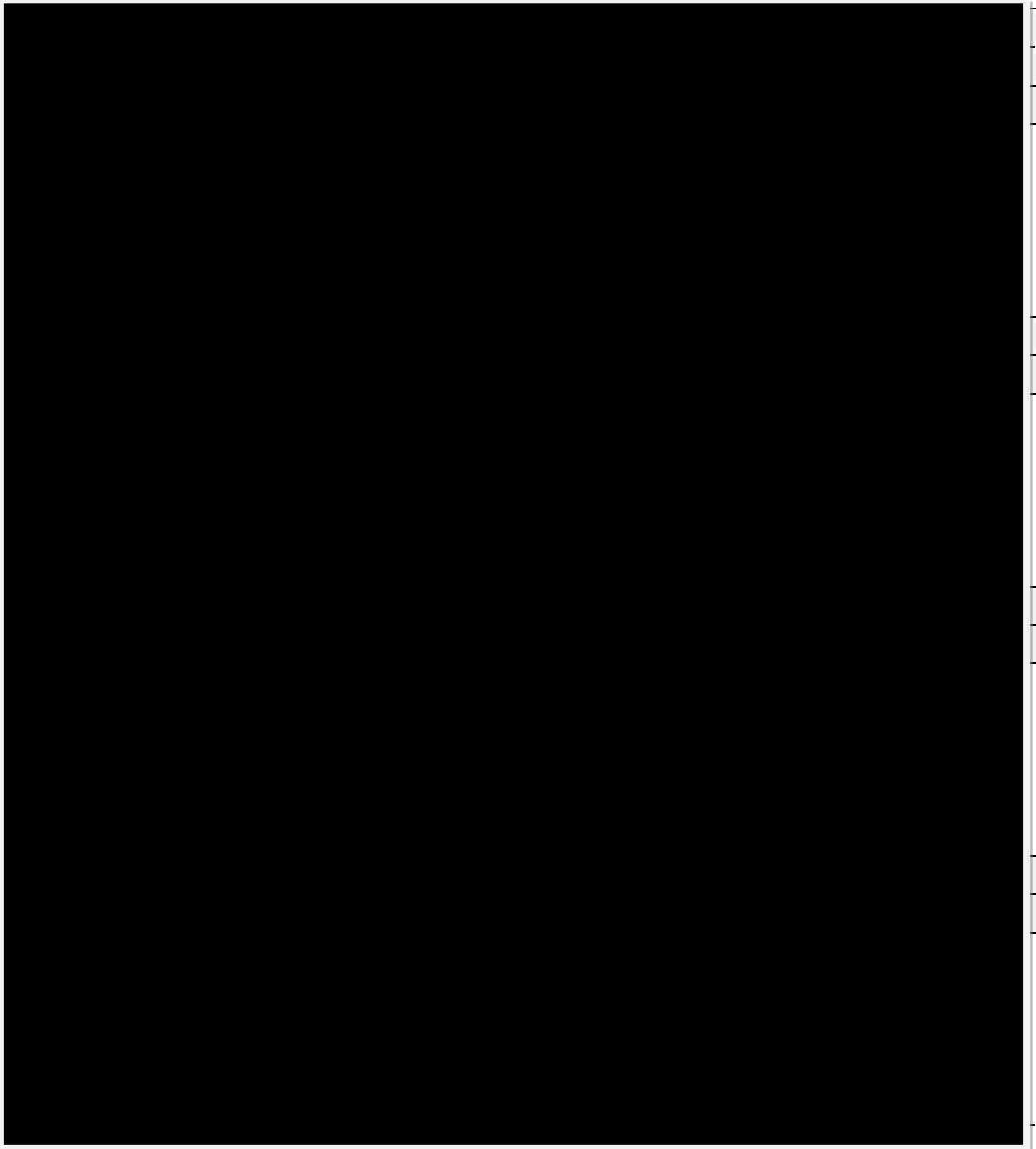
1Q, 2Q e 3Q: coletas realizadas após a primeira, segunda e terceira sessões de quimioterapia, respectivamente

Tabela 24: Escores de Dano (ED) no DNA observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) no Ensaio Cometa em T₁, submetidos a tratamentos, *in vitro*, com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos em relação à idade (≤ 45 anos e > 45 anos). Foram analisadas 100 células/tratamento/indivíduo.



* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo
X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

Tabela 25: Escores de Dano (ED) no DNA observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) no Ensaio Cometa em T₁, submetidos a tratamentos, *in vitro*, com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, de acordo com o hábito tabagista. Foram analisadas 100 células/tratamento/indivíduo.



* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo
X ± DP: Média ± Desvio Padrão

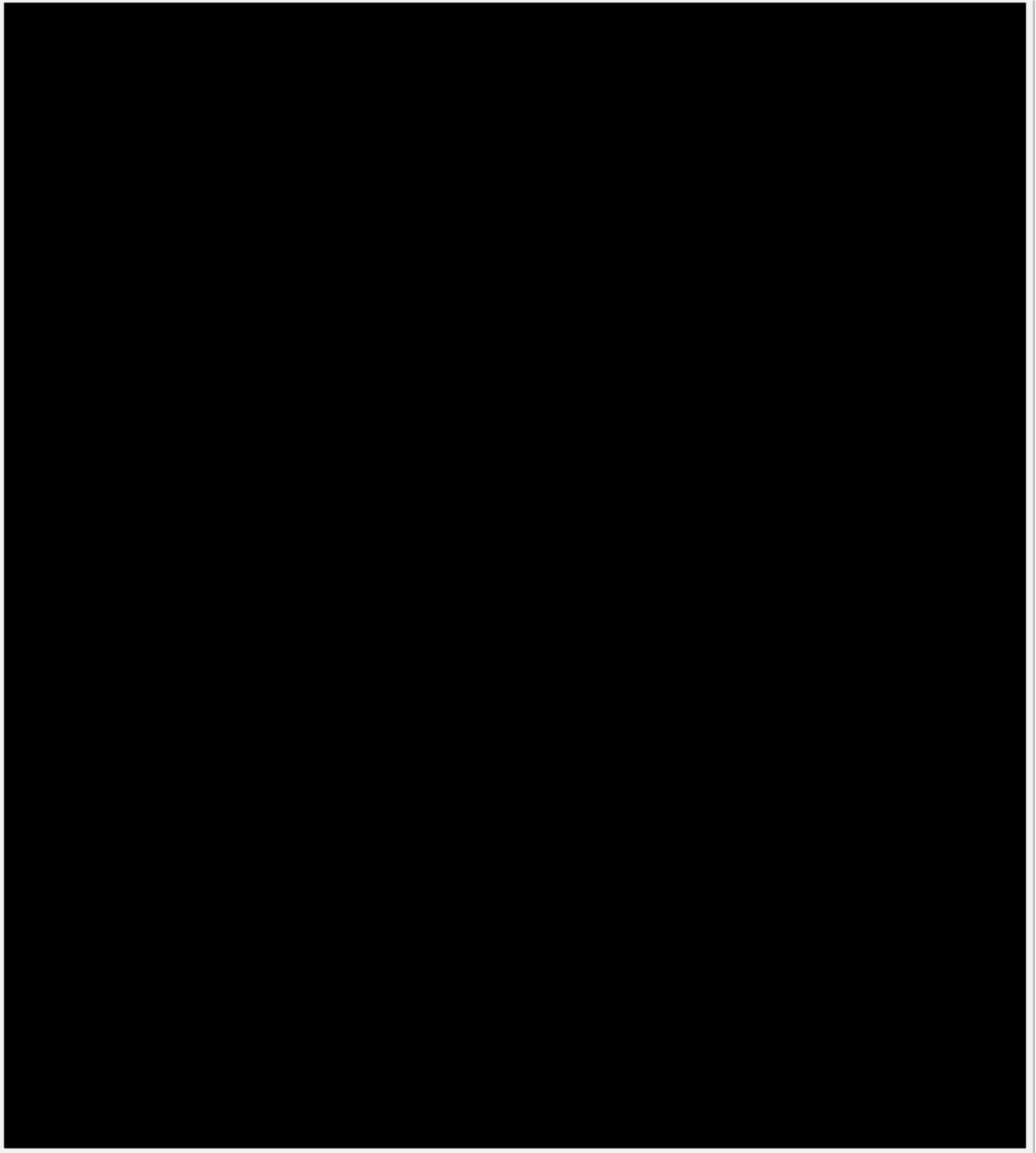
Tabela 26: Escores de Dano (ED) no DNA observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) no Ensaio Cometa em T₁, submetidos a tratamentos, *in vitro*, com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos de acordo com a ausência (*1*1) ou presença (*1*3 + *3*3) do alelo polimórfico para o gene CYP3A5. Foram analisadas 100 células/tratamento/indivíduo.

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo

Estatisticamente diferente do mesmo tipo de tratamento em comparação com o outro grupo de estudo

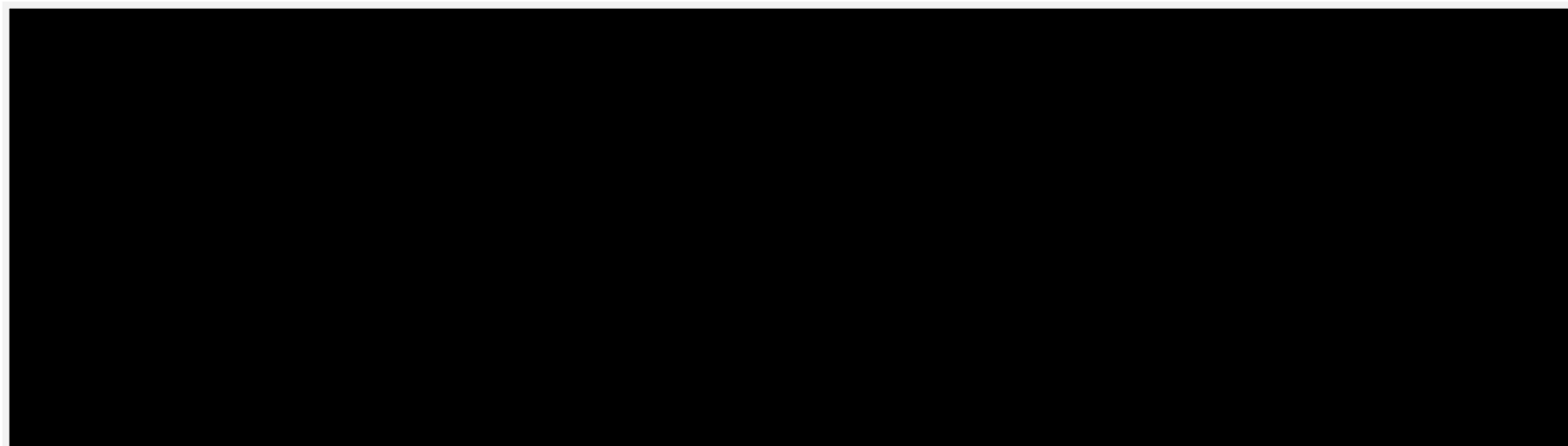
X ± DP: Média ± Desvio Padrão

Tabela 27: Escores de Dano (ED) no DNA observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano do grupo de mulheres saudáveis (40 indivíduos) e do grupo de pacientes com CM (20 indivíduos) no Ensaio Cometa em T₁, submetidos a tratamentos, *in vitro*, com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididos de acordo com a ausência (CC) ou presença (CA + AA) do alelo polimórfico para o gene *GSTO*. Foram analisadas 100 células/tratamento/indivíduo.



* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo
X ± DP: Média ± Desvio Padrão

Tabela 28: Escores de Dano (ED) no DNA observados em cultura de linfócitos do sangue periférico humano de pacientes com CM (20 indivíduos) nas amostras coletadas antes e durante o tratamento quimioterápico, no Ensaio Cometa em T₁, submetidos a tratamentos com docetaxel e/ou epirubicina e seus respectivos controles, divididas de acordo com a resposta patológica. Foram analisadas 100 células /tratamento/indivíduo.



Teste Mann-Whitney com $\alpha = 0,05$

X \pm DP: Média \pm Desvio Padrão

0Q: coleta realizada antes de iniciar a quimioterapia

1Q e 2Q: coletas realizadas após a primeira e segunda sessões de quimioterapia, respectivamente

DRE: Doença Residual Extensa (doença progressiva + doença estável)

DRM: Doença Residual Mínima (resposta patológica parcial)

RPC: Resposta Patológica Completa

* Estatisticamente diferente do tratamento controle negativo na mesma amostra

Estatisticamente diferente do mesmo tratamento em comparação à DRE na mesma coleta (0Q)

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em estudos epidemiológicos moleculares e citogenéticos, é necessário que o grupo de estudo seja pareado com o grupo controle de acordo com determinadas características, tais como: idade, sexo, hábito tabagista e etilista, entre outras.

Neste trabalho, os grupos de estudo não foram caracterizados quanto à etnia devido à particularidade da população brasileira ser multi-étnica, sendo constituída principalmente por descendentes ibéricos, africanos e sul-ameríndios (Amorim *et al.*, 2002). O estudo do DNA mitocondrial e do cromossomo Y revelou que grande parte da população brasileira é composta por descendentes de portugueses, africanos e ameríndios sul-americanos (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Sob este aspecto, portanto, a população brasileira torna-se interessante para comparação com outros estudos realizados em grupos étnicos bem definidos.

5.1 Os polimorfismos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO* e a suscetibilidade ao câncer de mama

A quimioterapia é usada em tumores de mama operáveis e inoperáveis para promover diminuição do tumor e torná-los tratáveis pela mastectomia radical ou pela radioterapia, ou com o objetivo de diminuir o estadió do tumor de modo que a cirurgia conservativa possa se transformar numa alternativa viável à mastectomia radical. Além disso, a quimioterapia neoadjuvante permite a avaliação da resposta do tumor primário a um regime particular de quimioterapia e fornece uma oportunidade adiantada de alterar os agentes, caso o tumor seja clinicamente resistente. Dessa forma, nos últimos anos, a quimioterapia neoadjuvante se tornou padrão de conduta para tumores de mama localmente avançados (Gralow *et al.*, 2008; Buzdar, 2007).

Por outro lado, uma parcela significativa dos tumores de mama é resistente a agentes quimioterápicos. Como resultado, a resistência a drogas se tornou a maior causa de

falha da quimioterapia e, conseqüentemente, a maior responsável pela mortalidade no câncer de mama. A predição da eficácia da quimioterapia pode selecionar corretamente pacientes que serão bons candidatos a responder bem ao tratamento e, igualmente, pode excluir os pacientes que terão efeitos secundários indesejáveis em vez dos benefícios do tratamento. Muitos estudos foram feitos para detectar fatores com caráter de previsão para várias modalidades quimioterapêuticas no câncer de mama, fatores tais como o tipo das células cancerosas, o índice mitótico, o status do *HER2*, receptor de hormônios e status do *p53* foram relatados como fatores com caráter de previsão (Wang *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2002; Amat *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2001; Kuerer *et al.*, 1999; Clahsen *et al.*, 1998).

Dessa forma, identificar as características do tumor específicas para cada paciente, que possam melhorar a habilidade de prever a resposta à terapia, ajudaria a aperfeiçoar o tratamento, melhorar resultados do tratamento e evitar a exposição desnecessária às toxicidades potenciais. Entretanto, embora sejam conhecidos os fatores que prevêm a resposta de tumores de mama à terapia hormonal, relativamente poucos estudos foram realizados para explicar os fatores que influenciam a resposta dos pacientes ao tratamento da quimioterapia de combinação (Subramaniam e Isaacs, 2005; Schmid *et al.*, 2002; Horwitz e McGuire, 1975; Low *et al.*, 1992).

Os estudos já realizados para resposta à quimioterapia no câncer da mama centraram-se sobre um único regime de quimioterapia, ou a uma única classe de drogas, ou no tratamento combinado da quimioterapia e da terapia hormonal, o que pode fornecer informação limitada ou comprometer a eficácia da quimioterapia sozinha (Van Poznak *et al.*, 2002; Faneyte *et al.*, 2003; Chhieng *et al.*, 2007; Bottini *et al.*, 2000; Makris *et al.*, 1997).

Assim, mais estudos clínicos que investiguem os biomarcadores com caráter de previsão ou prognósticos potenciais para a quimioterapia no câncer da mama são necessários, uma vez que pacientes que exibiram resposta patológica completa à quimioterapia mostraram melhor sobrevivência, livre de progressão, e sobrevivência total quando comparadas a pacientes com tumores residuais (Kuerer *et al.*, 1999; Tomczykowski *et al.*, 1999).

As variações genéticas (polimorfismos) podem contribuir com respostas alteradas à intervenção terapêutica e prejudicar a eficácia do tratamento (Gerson, 2002; Donnelly, 2004). Compreender a base dos mecanismos de variação na resposta e remodelar terapias, levando em conta as diferenças, poderia beneficiar consideravelmente sistemas de tratamento em que a variação genética está presente (MacAuley e Ladiges, 2005).

Dentre os candidatos para estudos estão os genes que codificam enzimas de biotransformação envolvidas no metabolismo de carcinógenos. Polimorfismos destes genes existem na população e muitos alteram a atividade da enzima, podendo aumentar ou diminuir a exposição humana a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos. Uma vez que muitas destas variações genéticas são relativamente comuns, as interações entre enzimas de metabolismo e fatores ambientais comuns podem ter impacto na população com risco de câncer (Mucci *et al.*, 2001). A maioria dos carcinógenos químicos necessita da ativação metabólica por enzimas de Fase I e a desintoxicação pela conjugação através das várias enzimas da Fase II. A expressão e regulação coordenadas das enzimas de metabolismo de xenobióticos das Fases I e II e seu balanço metabólico podem ser um fator importante na determinação da susceptibilidade ao câncer (Sato *et al.*, 2000).

Com base nessas informações, um dos objetivos deste estudo foi avaliar se os polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* estão relacionados com o risco de desenvolvimento do CM. Assim, foi determinada a frequência desses polimorfismos em uma amostra de 168 pacientes com CM e 187 mulheres saudáveis.

Primeiramente foi realizada a caracterização geral da amostra, onde foi observada diferença significativa na comparação entre pacientes com CM e mulheres saudáveis somente para os parâmetros menopausa e idade da primeira gestação nas amostras utilizadas na análise molecular. Com relação à menopausa, chama a atenção o fato da maioria das pacientes com CM (53%) não terem entrado na menopausa na época do diagnóstico, uma vez que a menopausa em idade tardia é considerada um fator de risco associado ao desenvolvimento de tumor na mama. Quanto à idade da primeira gestação, a

diferença observada se deve a grande porcentagem de mulheres saudáveis nuligestas (21,4%).

Todos os outros dados referentes à idade, ao hábito tabagista, à idade da menarca, à terapia de reposição hormonal e à existência de parentes com câncer apresentaram-se semelhantes entre pacientes com CM e mulheres saudáveis incluídas na análise molecular, não estando estes parâmetros relacionados ao desenvolvimento do CM nesta amostra de estudo.

Em relação ao polimorfismo *CYP3A4*1B*, não foram encontrados indivíduos portadores do alelo polimórfico em pacientes com CM e em mulheres saudáveis. Portanto, a amostra foi composta exclusivamente de indivíduos com genótipo homocigoto (AA) para o alelo selvagem.

A frequência alélica deste polimorfismo varia entre as diferentes etnias. Apesar de ocorrer em maior frequência em populações de origem africana, este alelo não é observado em chineses, tailandeses e japoneses (Fukushima-Uesaka *et al.*, 2004; Sata *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 1998; Ando *et al.*, 1999; Ball *et al.*, 1999; Paris *et al.*, 1999).

A frequência alélica de *CYP3A4*1B* está entre 0,036 a 0,096 em caucasianos, 0,48 a 0,80 em afro-descendentes, 0,093 a 0,107 em hispânicos e 0,089 em sauditas (Rebbeck *et al.*, 1998; Westlind *et al.*, 1999; Garcia-Martin *et al.*, 2002; Rebbeck, 2000; Amirimani *et al.*, 1999; Tayeb *et al.*, 2000).

Su *et al.* (2009) encontraram frequência de 0,08 para o alelo polimórfico *CYP3A4*1B* em 127 pacientes com câncer de mama, todas em pré-menopausa no momento do diagnóstico, enquanto DeMichele *et al.* (2005), num estudo com 90 pacientes com CM, observaram frequência de 0,045 para o mesmo alelo polimórfico. Em ambos os casos, os autores não fazem inferências a respeito da etnia.

Spurdle *et al.* (2002), num estudo caso-controle com australianas caucasianas, não encontraram relação entre o polimorfismo *CYP3A4*1B* e câncer de mama e câncer de útero, sendo a frequência genotípica para o polimorfismo, em homocigose, de 0,0% a 0,4% nos grupos.

Nossos resultados diferem, ainda, das freqüências encontradas por Cavalli *et al.* (2001), que observaram freqüência de 0,13 para o alelo polimórfico em 90 indivíduos brancos saudáveis no Brasil.

A mistura étnica da população brasileira, ocasionada por contínuos fluxos migratórios, poderia ser a responsável pelas diferentes freqüências observadas. Estudos mais amplos, incluindo um maior número de indivíduos das diferentes regiões do Brasil, seriam necessários para estabelecer a real prevalência do polimorfismo *CYP3A4*1B*, assim como para relacionar esta variante com o risco de desenvolvimento de CM.

Quanto ao polimorfismo *CYP3A5*3*, as freqüências genóticas e alélicas observadas não diferiram significativamente entre pacientes com CM e mulheres saudáveis. As freqüências alélicas observadas neste estudo para este polimorfismo foram 0,24 e 0,21 para pacientes com CM e mulheres saudáveis, respectivamente. Portanto, o polimorfismo *CYP3A5*3*, neste estudo, parece não estar relacionado ao risco de desenvolvimento de CM.

Há diferenças entre as etnias na freqüência das variantes alélicas de *CYP3A5*. A freqüência de *CYP3A5*3* varia em torno de 50% em afro-descendentes, até 70% em chineses e até 90% em caucasianos (Kuehl *et al.*, 2001).

Tucker *et al.* (2005), num estudo com 98 pacientes com CM em pós-menopausa, encontrou freqüência alélica polimórfica para *CYP3A5*3* de 0,45 e 0,22 para caucasianas e afro-descendentes, respectivamente. Segundo estes autores, ainda, mulheres caucasianas heterozigotas para *CYP3A5*3* possuem um risco aumentado de desenvolver câncer de mama quando comparadas com mulheres caucasianas homozigotas para este polimorfismo devido à alta freqüência de heterozigose na amostra.

Quanto ao polimorfismo *GSTO1*A140D*, não foi observada diferença significativa entre pacientes com CM e mulheres saudáveis quanto à freqüência alélica (0,23 em pacientes com CM e 0,30 em mulheres saudáveis). No entanto, verificamos diferença significativa entre os dois grupos de estudo em relação ao genótipo homozigoto polimórfico (AA), onde o grupo de mulheres saudáveis apresenta um número maior de indivíduos com este genótipo.

Marahatta *et al.* (2006) sugerem que o polimorfismo *GSTO1*A140D* pode ser um fator de risco no desenvolvimento do CM. As freqüências genótípicas e alélicas encontradas no nosso trabalho estão de acordo com o estudo realizado por Marahatta *et al.* (2006); no entanto, nossos resultados não relacionam este polimorfismo com o risco de desenvolvimento do CM na amostra estudada.

Assim como em outros polimorfismos, a freqüência de *GSTO1*A140D* varia de acordo com a etnia. Mukherjee *et al.* (2006), descreveram as freqüências do alelo polimórfico *GSTO1*A140D* para diferentes etnias: 0,12 em afro-descendentes, 0,26 em caucasianos, 0,14 em chineses e 0,23 em mexicanos.

Características clínico-patológicas das pacientes com CM como idade, tamanho do tumor, histologia, grau histológico, receptores hormonais, entre outras são fatores considerados para a escolha do melhor tratamento a ser utilizado em cada paciente. Por esta razão, a distribuição destas características foi examinada previamente à avaliação da resposta, com o intuito de determinar se existia associação com os diferentes genótipos para os polimorfismos *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D*. Esta análise, assim como a resposta patológica, foi realizada em 99 pacientes com CM submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirubicina.

Neste estudo não foi verificada associação entre as características clínico-patológicas e a distribuição dos genótipos para os polimorfismos dos genes *CYP3A5* e *GSTO*. Estes resultados indicam que cada um dos genótipos apresentava características semelhantes antes da quimioterapia neoadjuvante ser administrada; portanto, as diferentes respostas ao tratamento não seriam devido aos potenciais efeitos destas características.

Na análise da possível influência dos genótipos dos polimorfismos *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* sobre a resposta patológica, não foram observadas associações significativas. Além disso, podemos verificar que a distribuição das pacientes entre DRE e DRM+RPC ocorre de forma homogênea em cada genótipo. As porcentagens observadas neste estudo para DRE (27,3%) e DRM+RPC (72,7%) são semelhantes às observadas por

Wenzel *et al.* (2007) em pacientes com CM submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirubicina.

5.2 Danos basais e induzidos no DNA de pacientes com CM e mulheres saudáveis

5.2.1 Caracterização geral e freqüência dos polimorfismos dos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *GSTO* da amostra de avaliação citogenética

A idade, hábito tabagista, idade da menarca, status da menopausa, idade da primeira gestação, terapia de reposição hormonal e existência de parentes com câncer apresentaram-se semelhantes entre pacientes com CM e mulheres saudáveis incluídas na análise citogenética, garantindo assim uma uniformidade da amostra estudada e segurança dos dados obtidos nos ensaios *in vitro*.

Também foram estimadas as freqüências genotípicas e alélicas para os polimorfismos *CYP3A4*1*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* nas amostras utilizadas no estudo citogenético com o intuito de caracterizar a amostra sob este aspecto e, ainda, verificar se estas freqüências eram semelhantes às observadas para as amostras do estudo molecular.

Assim como na amostra total utilizada neste trabalho (355 indivíduos), na avaliação citogenética (60 indivíduos) também não foram observados indivíduos homocigotos polimórficos (GG) nem heterocigotos (AG) para o polimorfismo *CYP3A4*1B*, indicando freqüência alélica igual a 1,0 para o alelo A.

Quanto ao polimorfismo *CYP3A5*3*, também não foram observadas diferenças significativas entre pacientes com CM e mulheres saudáveis em relação às freqüências genotípicas e alélicas.

Para o polimorfismo *GSTO1*A140D*, foi observada diferença significativa para a presença do alelo polimórfico (em heterocigose ou homocigose) ($P= 0,05$) assim como na distribuição alélica, onde o grupo de mulheres saudáveis possui o alelo polimórfico em maior

freqüência ($P= 0,01$). Este resultado é consequência direta da maior proporção de indivíduos heterozigotos no grupo de mulheres saudáveis em relação ao grupo de pacientes com CM.

5.2.2 Teste do MN, IND e Ensaio Cometa

A formação de MNs é extensivamente utilizada em epidemiologia e citogenética como um biomarcador de dano cromossômico e instabilidade genética. A utilização do Teste do MN em estudos de biomonitoramento aumentou nos últimos anos, e grandes estudos internacionais contribuíram para melhorar a confiabilidade deste ensaio e fornecer diretrizes técnicas para a análise das principais fontes de variabilidade (Fenech *et al.*, 2003; Fenech *et al.*, 1999). Resultados recentes confirmam que um aumento na freqüência de MNs em linfócitos periféricos é um caráter de previsão de um risco aumentado de desenvolvimento de câncer, em particular câncer urogenital e gastrointestinal (Bonassi *et al.* 2007).

Micronúcleos podem refletir de forma mais específica alterações cromossômicas relevantes para a carcinogênese (Collins, 1998; Norppa, 2004). Em muitos estudos, a associação entre o MN e o risco de câncer não pode ser explicada somente pelo hábito de fumar tabaco ou pela exposição ocupacional a agentes carcinógenos (Bonassi *et al.*, 2007). Outros fatores podem estar envolvidos, incluindo ingestão de micronutrientes e a susceptibilidade individual, por exemplo, através de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos e reparo do DNA (Iarmarcovai *et al.*, 2008).

Este estudo também teve como objetivo avaliar os danos basais no DNA e induzidos, *in vitro*, pelos quimioterápicos docetaxel e epirubicina em pacientes com CM e em mulheres saudáveis. Para essa avaliação, foi utilizado o Teste do MN, o Índice de Divisão Nuclear e o Ensaio Cometa em linfócitos de sangue periférico humano.

No Teste do MN observamos diferença significativa entre os tratamentos controle negativo e de solvente em comparação com os tratamentos com os quimioterápicos, para pacientes com CM e mulheres saudáveis, indicativo de que as doses selecionadas para o ensaio, em experimento-piloto, foram eficientes na indução de MNs.

As frequências basais de MN (tratamento controle negativo) observadas neste trabalho, tanto no grupo de pacientes com CM quanto no grupo de mulheres saudáveis, estão de acordo com os dados encontrados na literatura (Bolognesi *et al.*, 1999; Varga *et al.*, 2006, Santos *et al.*, 2009), e as diferenças significativas encontradas entre pacientes com CM e mulheres saudáveis para este tratamento também foram observadas por Varga *et al.* (2006), Bonassi *et al.* (2007) e Santos *et al.* (2009).

Também foi verificada diferença significativa quando comparamos pacientes com CM com mulheres saudáveis, para os tratamentos com epirubicina e docetaxel + epirubicina no Teste do MN.

Não existem evidências diretas a respeito 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). Estes autores, num estudo caso-controle, também observaram aumento na frequência de MNs em linfócitos de pacientes com CM esporádico, e, segundo eles, duas possibilidades devem 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 à indução de danos no DNA e o reparo, resultando num fenótipo celular de aumento de sensibilidade a agentes mutagênicos.

Em relação às amostras de pacientes coletadas durante a quimioterapia, pode-se avaliar a indução de danos somente nas três primeiras coletas (0Q, 1Q e 2Q) quanto ao Teste do MN, devido à ausência de células binucleadas nas coletas posteriores; fato decorrente de parada do ciclo celular. A parada do ciclo celular em linfócitos durante o tratamento quimioterápico é uma consequência da exposição destas células ao docetaxel repetidamente, que, de acordo com Jordan *et al.* (1996), atua na estabilização de heterodímeros de tubulina, prejudicando a mitose e a proliferação celular.

Ainda com relação às amostras de pacientes coletadas durante a quimioterapia, as diferenças significativas observadas quando comparamos 0Q com 1Q, e

1Q com 2Q, confirmam o aumento progressivo da frequência de MNs no decorrer do tratamento em todos os tipos de tratamento, indicando que não ocorre reparo do dano no intervalo de três semanas. O mesmo resultado foi observado por Sánchez-Suárez *et al.* (2008) em linfócitos de pacientes com câncer de mama em tratamento quimioterápico adjuvante (com 5-fluoracil, epirubicina e ciclofosfamida) utilizando o Ensaio Cometa.

Foi realizada a análise dos resultados do Teste do MN de acordo com duas faixas etárias (≤ 45 anos e >45 anos) para verificar se o aumento da idade interfere da mesma forma em pacientes com CM e mulheres saudáveis.

Analisando os grupos separadamente, foi observado que o aumento da idade interfere somente na frequência basal de MNs (controle negativo e de solvente) em mulheres saudáveis, onde mulheres acima de 45 anos possuem frequência de MNs significativamente maior que mulheres saudáveis com idade até 45 anos. Estes resultados estão de acordo com Bolognesi *et al.* (1999) e Bolognesi *et al.* (1997), que também verificaram aumento de dano em linfócitos de indivíduos saudáveis com o aumento da idade.

Ainda na análise em função da idade, quando comparamos pacientes com CM e mulheres saudáveis dentro da mesma faixa etária (tanto ≤ 45 anos quanto >45 anos), pacientes com mais de 45 anos se mostraram mais sensíveis à indução de danos pelos tratamentos docetaxel e docetaxel + epirubicina, indicando aumento de sensibilidade com o aumento da idade. De acordo com Bohr (1995), Hanawalt *et al.* (1992) e Slagbroom e Vijg (1989), isto ocorre devido a um decréscimo da capacidade de reparo do DNA com o aumento da idade, acarretando em instabilidade genética.

Outro fator levado em consideração na análise dos resultados obtidos pelo Teste do MN foi o hábito tabagista, embora o grupo de fumantes corresponda somente a 20% das amostras. Foi verificado que, quando analisados os grupos de estudo separadamente, o hábito de fumar interfere na frequência de MNs somente em pacientes com CM nos tratamentos com docetaxel e docetaxel + epirubicina. Quando comparamos os dois grupos de estudo para o mesmo hábito, verificamos que pacientes com CM fumantes

apresentam freqüência de MNs significativamente maior do que mulheres saudáveis fumantes para os tratamentos com docetaxel, epirubicina e docetaxel + epirubicina. De forma geral, portanto, observamos que o tabagismo aumenta significativamente a freqüência de MNs em pacientes com CM, tornando este grupo de indivíduos suscetível aos danos induzidos pelos quimioterápicos.

Os resultados são controversos quanto à influência do tabagismo sobre os níveis basais de danos no DNA. Segundo Bonassi *et al.* (2003), linfócitos de sangue periférico de fumantes exibem freqüências significativamente maiores de MNs quando comparados com não-fumantes.

Os resultados obtidos neste estudo para danos no DNA causados pelo hábito tabagista em indivíduos saudáveis estão de acordo com Hoffmann e Speit (2005), que também não observaram diferenças significativas entre fumantes e não-fumantes no Teste do MN, assim como estão de acordo com Santos *et al.* (2009), que não observaram influência do tabagismo na freqüência de MNs em pacientes com CM e em mulheres saudáveis.

A análise da freqüência de MNs também foi realizada em relação à ausência ou presença dos alelos polimórficos para os genes *CYP3A5* e *GSTO* (para *CYP3A4* não foi realizada esta análise em função da ausência do alelo polimórfico na amostra de estudo), e, de forma geral, observamos que o genótipo não exerceu influência na freqüência de MNs nos dois grupos de estudo.

Na análise da freqüência de MNs em relação à resposta patológica das pacientes com CM nas amostras coletadas durante o tratamento quimioterápico, observamos que, de forma geral, não existe diferença significativa quando comparamos pacientes com DRE com pacientes com DRM+RPC. No entanto, o fato do grupo com DRM+RPC exibir freqüências maiores de MNs pode ser um indicativo de que este grupo possui uma sensibilidade maior a sofrer danos no DNA.

Foi observado, quanto ao IDN, que as diferenças entre os tratamentos controle negativo e controle de solvente se mantêm em relação aos tratamentos com os

quimioterápicos para os dois grupos, indicando que os tratamentos com docetaxel e epirubicina interferem na velocidade da divisão celular.

Quando se comparou pacientes com CM e mulheres saudáveis para o mesmo tipo de tratamento, foi verificada diferença significativa em todos os tratamentos testados, destacando o fato do grupo de pacientes com CM apresentar os menores valores de IDN em todos os casos, o que pode ser ocasionado por uma maior sensibilidade celular. Este resultado indica que, independente da presença ou ausência de substâncias químicas, os grupos de estudo se comportam de forma diferente quanto à velocidade do ciclo celular, o que é indicativo de que a presença da neoplasia pode afetar o ciclo celular.

A análise estatística das amostras coletadas durante o tratamento quimioterápico (0Q, 1Q e 2Q) mostra que há diferença significativa quanto ao IDN em todos os tipos de tratamentos. A gradativa redução do IDN nestas amostras, chegando até seu valor mínimo (1,000), onde se observaram apenas células mononucleadas, deve-se em grande parte à parada do ciclo celular induzida, principalmente, pelo docetaxel.

Na análise do IDN em função da idade (≤ 45 anos e > 45 anos), verificamos que este fator não interfere nos valores observados quando analisamos separadamente pacientes com CM e mulheres saudáveis. Além disso, observamos que indivíduos acima de 45 anos exibem valores menores de IDN, indicando a influência da idade neste tipo de avaliação da cultura celular.

A avaliação do IDN também foi realizada de acordo com o hábito tabagista. Verificamos que o hábito de fumar exerceu influência somente sobre o grupo de mulheres saudáveis, com diferença significativa para todos os tipos de tratamentos.

Ainda quanto aos valores de IDN, observamos novamente que os diferentes genótipos para *CYP3A5* e *GSTO* não exercem influência sobre este critério de avaliação.

Na análise dos valores de IDN em relação à resposta patológica, observamos que diferenças significativas entre as coletas aparecem somente em pacientes com DRM+RPC, o que parece ser um indicativo de que indivíduos considerados bons

respondedores ao tratamento quimioterápico apresentam uma maior sensibilidade em sofrer transtornos na cinética de divisão celular.

Há um crescente interesse no Ensaio Cometa por este ser um método simples para detecção níveis de danos no DNA em células individuais em testes genotóxicos e de biomonitoramento sob várias circunstâncias (Singh *et al.*, 1988). 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).

No Ensaio Cometa, não foi observada diferença significativa no escore de dano (ED) em T_0 quando comparados os diferentes tratamentos dentro de cada grupo. Este resultado era esperado e se deve ao fato desta alíquota ter sido retirada antes das culturas serem submetidas aos diferentes tratamentos *in vitro*, indicando que as culturas de linfócitos estavam em um mesmo nível basal de dano celular, o que comprova a viabilidade destas nos dois grupos de estudo, mostrando a homogeneidade das amostras.

Esta viabilidade celular é novamente observada em T_1 e T_2 para os tratamentos controle negativo e de solvente, indicando que os procedimentos experimentais pelos quais as culturas de linfócitos são submetidas não acarretam na elevação significativa do escore de dano.

Em T_1 , tanto para pacientes com CM quanto para mulheres saudáveis, foi verificada diferença significativa na comparação entre os tratamentos controle negativo e controle de solvente em relação aos demais grupos de tratamento, demonstrando novamente a eficácia dos quimioterápicos utilizados em induzir o dano. Ainda em T_1 , foi verificado que o ED não difere significativamente entre os dois grupos, indicando que não houve diferença no ED basal e na indução de dano pelos quimioterápicos quando comparamos mulheres saudáveis com pacientes com CM. Nossos resultados estão de

acordo com Nadin *et al.* (2006), que observaram a ausência de diferença significativa entre pacientes com câncer e indivíduos sadios na indução de dano, *in vitro*, pela doxorubicina.

Uma série de estudos, a maioria utilizando o Ensaio Cometa em pH alcalino, relatam que, em uma população adulta, linfócitos de sangue periférico podem exibir vários graus de danos ao DNA (Moller, 2005; Moller *et al.*, 2000; Valverde *et al.*, 1997). Além disso, o fato de não encontrarmos diferença significativa entre pacientes com CM e mulheres saudáveis nos tratamentos com os quimioterápicos docetaxel e epirubicina pode ser devido ao tipo de dano provocado por estes compostos, os quais não seriam observados com o Ensaio Cometa em pH alcalino (quebras de fita dupla, por exemplo).

Sánchez-Suárez *et al.* (2008) num estudo realizado em pacientes com CM utilizando o Ensaio Cometa em pH alcalino e pH neutro, observaram que os níveis de quebras de fita simples e de fita dupla são elevados em pacientes mesmo antes do tratamento, e apontam a possibilidade de que pacientes com CM sofrem, na verdade, de algum tipo de fragilidade no DNA, tornando-as mais suscetíveis a mutagênicos ambientais.

Após quatro horas de incubação (T_2), os níveis de danos em ambos os grupos de estudo foram semelhantes àqueles observados em T_1 , indicando que não houve redução significativa do dano induzido nos linfócitos.

Em relação às amostras de pacientes coletadas durante a quimioterapia, não existe diferença significativa entre as diferentes coletas (0Q, 1Q, 2Q e 3Q), apesar de haver um aumento gradativo no ED. Sánchez-Suárez *et al.* (2008), num estudo com pacientes com câncer de mama em tratamento quimioterápico adjuvante (com 5-fluoracil, epirubicina e ciclofosfamida), verificaram, utilizando o Ensaio Cometa, que o dano induzido a cada ciclo de quimioterapia não é reparado depois de três semanas (intervalo entre cada ciclo), o que sugere que o dano provocado no DNA persiste ao longo do tratamento.

No Ensaio Cometa, observamos que não existe influência da idade (≤ 45 anos e > 45 anos), dos diferentes genótipos para *CYP3A5* e *GSTO* e do hábito tabagista sobre o ED no Ensaio Cometa nesta amostra de estudo. Hoffmann e Speit (2005) e Bonassi *et al.* (2007) também não verificaram influência do hábito tabagista no Ensaio Cometa.

Sánchez-Suárez *et al.* (2008) não encontraram qualquer correlação significativa entre os ED no DNA e a resposta patológica à quimioterapia. Neste estudo, observamos diferença significativa entre pacientes com DRE e pacientes com DRM+RPC apenas na amostra coletada antes de iniciar o tratamento quimioterápico (0Q), destacando o fato do grupo de pacientes com melhor resposta (DRM+RPC) possuir os menores valores de ED.

Verificamos neste estudo que pacientes com CM diferem de mulheres saudáveis nos danos induzidos pelos quimioterápicos no Teste do MN, mas não diferem de acordo com o Ensaio Cometa. Em conjunto, esses dados indicam que os dois grupos de estudo inicialmente sofrem a indução de danos na mesma intensidade (Ensaio Cometa), porém após uma divisão celular completa (Teste do MN) esses danos permanecem somente em pacientes com CM, evento que pode ser explicado por um reparo de danos no DNA mais eficiente ou apoptose em mulheres saudáveis.

Embora este trabalho tenha apresentado diversos dados relevantes, ainda restam questões a serem esclarecidas a fim de estabelecer estratégias de investigação científica seguras para a identificação dos fatores envolvidos na suscetibilidade ao CM, contribuindo ainda para o desenvolvimento de tratamentos mais adequados para cada paciente e para cada tipo de câncer, visando maior sucesso na terapia e, conseqüentemente, melhora na sobrevida e na qualidade de vida das pacientes.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O presente estudo propôs-se investigar a indução de danos, *in vitro*, no DNA e a recuperação ou sensibilidade celular adquirida frente aos quimioterápicos docetaxel e epirubicina em pacientes com CM e em mulheres saudáveis, estabelecer a frequência dos polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* e relacionar os dados obtidos *in vitro* com os genomas individuais relacionados aos polimorfismos gênicos. Os resultados obtidos e discutidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. Não foi verificada associação significativa entre os polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* e o risco de desenvolvimento de câncer de mama.
2. Os polimorfismos analisados não apresentaram associações relevantes em relação à resposta patológica após a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirubicina e às demais variáveis clínicas avaliadas.
3. Pacientes com CM e mulheres saudáveis diferem significativamente quanto à frequência basal de MNs e quanto à indução de danos no DNA no Teste do MN.
4. Ocorre aumento significativo na frequência de MNs durante o tratamento quimioterápico, indicando acúmulo de dano no DNA nas pacientes com CM analisadas.
5. A idade exerceu influência somente sobre mulheres saudáveis, onde mulheres acima de 45 anos possuem frequência basal de MNs significativamente maiores do que mulheres com idade até 45 anos.
6. O tabagismo interfere significativamente na frequência de MNs em pacientes com CM, tornando este grupo mais suscetível aos danos induzidos pelos quimioterápicos testados.
7. Os diferentes genótipos estudados não interferem na frequência de MNs em pacientes com CM e em mulheres saudáveis.

8. Não foi observada correlação entre freqüência de MNs e resposta patológica das pacientes com CM submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirubicina.
9. Pacientes com CM apresentam valores de IDN significativamente menores do que mulheres saudáveis em todos os tratamentos utilizados.
10. Ocorre redução significativa dos valores de IDN durante o tratamento quimioterápico.
11. A idade, o hábito tabagista, os diferentes genótipos analisados e a resposta patológica não apresentam correlação com os valores de IDN observados nos grupos de estudo.
12. No Ensaio Cometa, não são observadas diferenças significativas entre pacientes com CM e mulheres saudáveis nos tratamentos realizados, assim como não são observadas diferenças significativas entre as amostras coletadas durante a quimioterapia, embora ocorra aumento gradual dos valores de ED.
13. No Ensaio Cometa, não houve redução significativa do dano induzido nos linfócitos após quatro horas de incubação nos dois grupos de estudo.
14. A idade, o hábito tabagista e os diferentes genótipos não apresentam correlação com os ED observados no Ensaio Cometa, tanto em pacientes com CM quanto em mulheres saudáveis.
15. Observamos no Ensaio Cometa que pacientes com DRM+RPC possuem valores de ED significativamente menores que pacientes com DRE antes de iniciar o tratamento quimioterápico (OQ).

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRESTI, A. A survey of exact inference for contingency tables. *Statistical Science*, 7:131-53, 1992.
- AMAT, S.; PENNAULT-LLOORCA, F.; CURE, H.; LE BOUEDEC, G.; ACHARD, J. L.; VAN PRAAGH, I.; FEILLEL, V.; MOURET-REYNIER, M.; DAUPLAT, J.; CHOLLET, P. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Oncology*, 20: 791-796, 2002.
- AMIRIMANI, B.; WALKER, A. H.; WEBER, B. L.; REBBECK, T. R. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 1587-1590, 1999.
- AMORIM, L. M. F.; ROSSINI, A.; MENDONÇA, G. A. S.; LOTSCH, P. F.; SIMÃO, T. A.; GALLO, C. V. M.; RIBEIRO PINTO, L. F. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Letters*, 181: 179-186, 2002.
- ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 13(1): 67-73, 1998.
- ANDO, Y.; TATEISHI, T.; SEKIDO, Y.; YAMAMOTO, T.; SATOH, T.; HASEGAWA, Y.; KOBAYASHI, S.; KATSUMATA, Y.; SHIMOKATA, K.; SAITO, H. Re: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *Journal of the National Cancer Institute*, 91:1587-1590, 1999.
- BALL, S. E.; SCATINA, J.; KAO, J.; FERRON, G. M.; FRUNCILLO, R.; MAYER, P.; WEINRYB, I.; GUIDA, M.; HOPKINS, P. J.; WARNER, N.; HALL, J. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 66: 288-294, 1999.
- BLASIAK, J.; ARABSKI, M.; KRUPA, R.; WOZNIAK, K.; RYKALA, J.; KOLACINSKA, A.; MORAWIEC, Z.; DRZEWOSKI, J.; ZADROZNY, M. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutation Research*, 554: 139-148, 2004.
- BOARD, P. G.; COGGAN, M.; CHELVANAYAGAM, G.; EASTEAL, S.; JERMIN, L. S.; SCHULTE, G.; et al. Identification, characterization and crystal structure of Omega class glutathione transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 24798-24806, 2000.
- BOHR, V. A. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis*, 16: 2885-2892, 1995.
- BOLOGNESI, C.; LANDO, C.; FORNI, A.; LANDINI, E.; SCARPATO, R.; MIGLIORE, L.; BONASSI, S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and Ageing*, 28: 393-397, 1999.
- BOLOGNESI, C.; ABBONDANDOLO, A.; BARALE, R.; CASALONE, R.; DALPRÀ, L.; FERRARI, M.; DEGRASSI, F.; FORNI, A.; LAMBERTI, L.; LANDO, C.; MIGLIORE, L.; PADOVANI, P.; PASQUINI, R.; PUNTONI, R.; SBRANA, I.; STELLA, M.; BONASSI, S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 6: 249-256, 1997.
- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631, 2007.

- BONASSI, S.; NERI, N.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y. P.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research*, 543: 155-166, 2003.
- BOTTINI, A.; BERRUTI, A.; BERSIGA, A.; BRIZZI, M. P.; BRUNELLI, A.; GORZEGNO, G.; DIMARCO, B.; AGUGGINI, S.; BOLSI, G.; CIRILLO, F.; FILIPPINI, L.; BETRI, E.; BERTOLI, G.; ALQUATI, P.; DOGLIOTTI, L. p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 6: 2751-2758, 2000.
- BUZDAR, A. U. Preoperative chemotherapy treatment of breast cancer - a review. *Cancer*, 110: 2394-2407, 2007.
- CARVALHO-SILVA, D.; SANTOS, F. R.; ROCHA, J.; PENA, S. D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *The American Journal of Human Genetics*, 68: 281-286, 2001.
- CAVALLI, S. A.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Detection of MbolI Polymorphism at the 5' Promoter Region of CYP3A4. *Clinical Chemistry*, 47: 348-351, 2001.
- CHHIENG, D. C.; RODRIGUEZ-BURFORD, C.; MELETH, S.; GRIZZLE, W. E.; FERGUSON, S. M. Assessment of biomarker expression in predicting pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Breast Journal*, 13: 534-535, 2007.
- CLAHSEN, P. C.; VAN DE VELDE, C. J. H.; DUVAL, C.; PALLUD, C.; MANDARD, A. M.; DELOBELLE-DEROIDE, A.; VAN DEN BROEK, L.; SAHMOUD, T. M.; VAN DE VIJVER, M. J. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 16: 470-479, 1998.
- COLLINS, A. R. Molecular epidemiology in cancer research. *Molecular Aspects of Medicine*, 19: 359-432, 1998.
- DEMICHELE, A.; APLENC, R.; BOTBYL, J.; COLLIGAN, T.; WRAY, L.; KLEIN-CABRAL, M.; FOULKES, A.; GIMOTTY, P.; GLICK, J.; WEBER, B.; STADTMAUER, E.; REBBECK, T. R. Drug-Metabolizing Enzyme Polymorphisms Predict Clinical Outcome in a Node-Positive Breast Cancer Cohort. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (24): 5552-5559, 2005.
- DE WILDT, S. N.; KEARNS, G. L.; LEEDER, J. S.; VAN DEN ANKER, J. N. Cytochrome P450 3A: Ontogeny and drug disposition. *Clinical Pharmacokinetics*, 37: 485-505, 1999.
- DONNELLY, J. G. Pharmacogenetics in cancer chemotherapy: balancing toxicity and response. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26: 231-235, 2004.
- EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13(1): 34-43, 1989.
- EVANS, W.E.; HON, Y. Y.; BOMGAARS, L.; COUTRE, S.; HOLDSWORTH, M.; JANCO, R.; KALWINSKY, D.; KELLER, F.; KHATIB, Z.; MARGOLIN, J.; MURRAY, J.; QUINN, J.; RAVINDRANATH, Y.; RITCHEY, K.; ROBERTS, W.; ROGERS, Z. R.; SCHIFF, D.; STEUBER, C.; TUCCI, F.; KORNEGAY, N.; KRYNETSKI, E. Y.; RELING, M. V. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine, *Journal of Clinical Oncology*, 19: 2293-2301, 2001.
- FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P.L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59, 1995.
- FALCK, G.; CATALÁN, J.; NORPPA, H. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei without cytochalasin B. *Mutation Research*, 392: 71-79, 1997.

FANEYTE, I. F.; SCHRAMA, J. G.; PETERSE, J. L.; REMIJNSE, P. L.; RODENHUIS, S.; VAN DE VIJVER, M. J. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *British Journal of Cancer*, 88: 406-412, 2003.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95, 2000.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research*, 392: 11-18, 1997.

FENECH, M.; BONASSI, S.; TURNER, J.; LANDO, C.; CEPPI, M.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CAO, J.; DE LUCA, G.; DI GIORGIO, M.; FERGUSON, L. R.; FUCIC, A.; LIMA, O. G.; HADJIDEKOVA, V. V.; HRELIA, P.; JAWORSKA, A.; JOKSIC, G.; KRISHNAJA, A. P.; LEE, T. K.; MARTELLI, A.; MCKAY, M. J.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; MULLER, W. U.; ODAGIRI, Y.; ORSIERE, T.; SCARFI, M. R.; SILVA, M. J.; SOFUNI, T.; SURRALLES, J.; TRENTA, G.; VOROBTSOVA, I.; VRAL, A.; ZIJNO, A. Intra- and interlaboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research*, 534: 45-64, 2003.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The HUman micronucleus project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428: 271-283, 1999.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147: 29-36, 1985.

FERRARI, I. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. *Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese. Métodos e critérios de avaliação*. Ed Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. L. R. and Monteleone-Neto, R. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto – SP. 107-112, 1991.

FISHER, E. R.; WANG, J.; BRYANT, J.; FISHER, B.; MAMOUNAS, E.; WOLMARK, N. Pathobiology of preoperative chemotherapy finding from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) Protocol B-18. *Cancer*, 95: 681-695, 2002.

FRIEAUFF, W., HARTMANN, A.; SUTER, W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*, 16(2): 133-137, 2001.

FUKUSHIMA-UESAKA, H.; SAITO, Y.; WATANABE, H.; SHISEKI, K.; SAEKI, M.; NAKAMURA, T.; KUROSE, K.; SAI, K.; KOMAMURA, K.; UENO, K.; KAMAKURA, S.; KITAKAZE, M.; HANAI, S.; NAKAJIMA, T.; MATSUMOTO, K.; SAITO, H.; GOTO, Y.; KIMURA, H.; KATOH, M.; SUGAI, K.; MINAMI, N.; SHIRAO, K.; TAMURA, T.; YAMAMOTO, N.; MINAMI, H.; OHTSU, A.; YOSHIDA, T.; SAIJO, N.; KITAMURA, Y.; KAMATANI, N.; OZAWA, S.; SAWADA, J. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Human Mutation*, 23:100, 2004.

GARCÍA-MARTÍN, E.; MARTÍNEZ, C.; PIZARRO, R. M.; GARCÍA-GAMITO, F. J.; GULLSTEN, H.; RAUNIO, H.; AGÚNDEZ, J. A. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 71: 196-204, 2002.

GELLNER, K.; EISELT, R.; HUSTERT, E.; ARNOLD, H.; KOCH, I.; HABERL, M.; DEGLMANN, C. J.; BURK, O.; BUNTEFUSS, D.; ESCHER, S.; BISHOP, C.; KOEBE, H. G.; BRINKMANN, U.; KLENK, H. P.; KLEINE, K.; MEYER, U. A.; WOJNOWSKI, L. Genomic organization of the human CYP3A locus: Identification of a new, inducible CYP3A gene. *The Pharmacogenomics Journal*, 3: 53-61, 2001.

GERSON, S. L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20: 2388-2399, 2002.

GODOY, W.; ALBANO, R. M.; MORAES, E. G.; PINHO, P. R. A.; NUNES, R. A.; SAITO, E. H.; HIGA, C.; FILHO, I. M.; KRUEL, C. D. P.; SCHIRMER, C. C.; GURSKI, R.; LANG, M. A.; RIBEIRO PINTO, L. F. CYP2A6/2A7 and CYP 2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-

individual variation in expression and relevance to nitrosamine carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 23: 611-616, 2002.

GONZALEZ, F. J.; GELBOIN, H. V. Role of cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metabolism Reviews*, 26: 165-183, 1994.

GRALOW, J. R.; BURSTEIN, H. J.; WOOD, W.; HORTOBAGYI, G. N.; GIANNI, L.; VON MINCKWITZ, G.; BUZDAR, A. U.; SMITH, I. E.; SYMMANS, W. F.; SINGH, B.; WINER, E. P. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *Journal of Clinical Oncology*, 26: 814-819, 2008.

HAIMAN, C. A.; HANKINSON, S. E.; SPIEGELMAN, D.; DE VIVO, I.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; SPEIZER, Z. E.; HUNTER, D. J. A tetranucleotide repeat polymorphism in CYP19 and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, 87: 204-210, 2000.

HANAWALT, P. C.; GEE, P.; HO, L.; HSU, R. K.; KANE, C. J. M. Genomic heterogeneity of DNA repair. Role in aging? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663: 17-25, 1992.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, E.; KISKINIS, F.; POETTER, H. J.; MARTUS, A.; FJALLMAN, W.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 103-118, 2001a.

HARTMANN, A.; KISKINIS, F.; FJALLMAN, W.; SUTER, W. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in alkaline Comet assay. *Mutation Research*, 497: 199-212, 2001b.

HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; POETTER, F.; SUTER, W. Comparative study with alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research*, 536: 27-38, 2003.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31: 273-300, 1999.

HEDDLE, J. A. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: Evans, H. J. and Lloyd, D. C. (Eds.), *Mutation-Induced Chromosome Damage to Man*, Edinburgh University Press, pp. 191-200, 1976.

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

HONIG, S. Treatment of metastatic disease. In: Harris, J.; Lipman, M.; Morrow, M; et al (eds) *Diseases of the breast*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 669-734, 1996.

HORWITZ, K. B. and MCGUIRE, W. L. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science*, 189: 726-727, 1975.

HUANG, Z.; GUENGERICH, F. P.; KAMINSKY, L. S. 16Alpha-hydroxylation of estrone by human cytochrome P4503A4/5. *Carcinogenesis*, 19: 867-872, 1998.

IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research*, 658:215-233, 2008.

INCA: Instituto Nacional do Câncer (2009). Home Page: www.inca.gov.br

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

JORDAN, M.; WENDELL, K.; GARDINER, S.; DERRY, W.; COPP, H.; WILSON, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research*, 56: 816-825, 1996.

- KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 363: 89-96, 1996.
- KLEINBAUM, D.G.; KUPPER, L.L.; MORGENSTEN, H. *Epidemiologic research: principles and quantitative methods*. Belmont, CA: Wadsworth, 1982.
- KUEHL, P.; ZHANG, J.; LIN, Y.; LAMBA, J.; ASSEM, M.; SCHUETZ, J.; WATKINS, P. B.; DALY, A.; WRIGHTON, S. A.; HALL, S. D.; MAUREL, P.; RELLING, M.; BRIMER, C.; YASUDA, K.; VENKATARAMANAN, R.; STROM, S.; THUMMEL, K.; BOGUSKI, M. S.; SCHUETZ, E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genetics*, 27:383-391, 2001.
- KUERER, H. M.; NEWMAN, L. A.; SMITH, T. L.; AMES, F. C.; HUNT, K. K.; DHINGRA, K.; THERIAULT, R. L.; SINGH, G.; BINKLEY, S. M.; SNEIGE, N.; BUCHHOLZ, T. A.; ROSS, M. I.; MCNEESE, M. D.; BUZDAR, A. U.; HORTOBAGYI, G. N.; SINGLETARY, S. E. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin- based neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 460-469, 1999.
- KUTE, T. E.; GRONDAHL-HANSEN, J.; SHAO, S. M.; LONG, R.; RUSSEL, G.; BRUNNER, N. Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of node negative breast cancer patients with low risk of recurrence. *Breast Cancer Research and Treatment*, 47: 9-16, 1998.
- LADNER, J. E.; PARSONS, J. F.; RIFE, C. L.; GILLILAND, G. L.; ARMSTRONG, R. N. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*, 43: 352-361, 2004.
- LI, Y. J.; OLIVEIRA, S. A.; XU, P.; MARTIN, E. R.; STENGER, J. E.; SCHERZER, C.; et al. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age of onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Human Molecular Genetics*, 12: 3259-3267, 2003.
- LOW, S. C.; DIXON, A. R.; BELL, J.; ELLIS, I. O.; ELSTON, C. W.; ROBERTSON, J. F.; BLAMEY, R. W. Tumour oestrogen receptor content allows selection of elderly patients with breast cancer for conservative tamoxifen treatment. *British Journal of Surgery*, 79: 1314-1316, 1992.
- MACAULEY, A.; LADIGES, W. C. Approaches to determine clinical significance of genetic variants. *Mutation Research*, 573: 205-220, 2005.
- MAJUMDAR, A. K.; MCCREA, J. B.; PANEBIANCO, D. L.; et al. Effects of aprepitant on cytochrome P450 3A4 activity using midazolam as a probe. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 74: 150-156, 2003.
- MAKRIS, A.; POWLES, T. J.; DOWSETT, M.; OSBORNE, C. K.; TROTT, P. A.; FERNANDO, I. N.; SHLEY, S. E.; ORMEROD, M. G.; TITLEY, J. C.; GREGORY, R. K.; ALLRED, D. C. Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 3: 593-600, 1997.
- MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. *Biomonitorização do dano genético em humanos. Genética Toxicológica*. Ed: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Porto Alegre: Editora Alcance, pp. 183-205, 2003.
- MARAHATTA, S. B.; PUNYARIT, P.; BHUDISAWASDI, V.; PAUPAIROJ, A.; WONGKHAM, S.; PETMITR, S. Polymorphism of glutathione S-transferase Omega gene and risk of cancer. *Cancer Letters*, 236: 276-281, 2006.
- MATTER, B.; SCHIMID, W. Trenimon-induced chromosome damage in bone-marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test. *Mutation Research*, 12: 217-225, 1971.
- MILLER, M. C.; MOHRENWEISER, H. W.; BELL, D. A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*, 120: 269-280, 2001.

- MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96 (Suppl. 1): 1-42, 2005.
- MOLLER, P.; KNUDSEN, L. E.; LOFT, S.; WAALIN, H. The Comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 9: 1005-1015, 2000.
- MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATIPPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 20: 613-616, 1960.
- MUCCI, L. A.; WEDREN, S.; TAMINI, R. M.; TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H. O. The role of gene-environment in the etiology of human cancer: examples from cancers of the bowel, lung and breast. *Journal of Internal Medicine*, 249: 477-493, 2001.
- MUKHERJEE, B.; SALAVAGGIONE, O. E.; PELLEYMOUNTER, L. L.; MOON, I.; ECKLOFF, B. W.; SCHAID, D. J.; WIEBEN, E. D.; WEINSHILBOUM, R. M. Glutathione s-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metabolism and Disposition*, 34:1237-1246, 2006.
- NABHOLTZ, J. M.; SENN, H. J.; BEZWODA, W. R.; MELNYCHUK, D.; DESCHENES, L.; DOUMA, J.; VNDENBERG, T. A.; RAPOPORT, B.; ROSSO, R.; TRILLET-LENOIR, V.; DRBAL, J.; MOLINO, A.; NORTIER, J. W.; RICHEL, D. J.; NAGYKALNAI, T.; SIEDLECKI, P.; WILKING, N.; GENOT, J. Y.; HUPPERETS, P. S.; PNNUTI, F.; SKARLOS, D.; TOMIAK, E. M.; MURAWSKY, M.; ALAKL, M.; AAPRO, M. Prospective randomized trial of docetaxel versus mitomycin plus vinblastine in patients with metastatic breast cancer progressing despite previous anthracycline-containing chemotherapy. 304 Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 1413-1424, 1999.
- NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L.M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D. R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Letters*, 239: 84-97, 2006.
- NAGASUBRAMANIAN, R.; INNOCENTI, F.; RATAIN, M. J. Pharmacogenetics in cancer treatment. *Annual Review of Medicine*, 54: 437-452, 2003.
- NAGY, R.; SWEET, K.; ENG, C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 23: 6445-6470, 2004.
- NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149: 309-334, 2004.
- OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, P. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198: 259-267, 1992.
- OLOPADE, O. I.; PICHERT, G. Cancer genetics in oncology practice. *Annals of Oncology*, 12: 895-908, 2001.
- PARIS, P. L.; KUPELIAN, P. A.; HALL, J. M.; WILLIAMS, T. L.; LEVIN, H.; KLEIN, E. A.; CASEY, G.; WITTE, J. S. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 8:901-905, 1999.
- PERERA, F. P.; WEINSTEIN, I. B. Molecular epidemiology: recent advances and future direction. *Carcinogenesis*, 21: 517-524, 2000.
- PETIT, T.; BOREL, C.; GHNASSIA, J. P.; RODIER, J. F.; ESCANDE, A.; MORS, R.; HAEGELE, P. Chemotherapy response of breast cancer depends on HER-2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting. *Clinical Cancer Research*, 7: 1577-1581, 2001.

- PETROS, W. P.; HOPKINS, P. J.; SPRUILL, S.; BROADWATER, G.; VREDENBURGH, J. J.; COLVIN, O. M.; PETERS, W. P.; JONES, R. B.; HALL, J.; MARKS, J. R. Associations Between Drug Metabolism Genotype, Chemotherapy Pharmacokinetics, and Overall Survival in Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 1-9, 2005.
- PETROS, W. P.; BROADWATER, G.; BERRY, D.; JONES, R. B.; VREDENBURGH, J. J.; GILBERT, C. J.; GIBBS, J. P.; COLVIN, O. M.; PETERS, W. P. Association of high-dose cyclophosphamide, cisplatin and carmustine pharmacokinetics with response, toxicity and dosing weight in patients with primary breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 8: 698-705, 2002.
- REBBECK, T. R. More about: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4 (Letter). *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 76, 2000.
- REBBECK, T. R.; JAFFE, J. M.; WALKER, A. H.; WEIN, A. J.; MALKOWICZ, S. B. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *Journal of the National Cancer Institute*, 90: 1225-1229, 1998.
- RIBAS, G., FRENZILLI, G., BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research*, 344: 41-54, 1995.
- RISCH, A.; WIKMAN, H.; THIEL, S.; SCHMEZER, P.; EDLER, L.; DRINGS, P.; DIENEMANN, H.; KAYSER, K.; SCHULZ, V.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Glutathione S-transferase M1, M3, T1 and P1 polymorphism and susceptibility to non-cell lung cancer subtypes and hamartomas. *Pharmacogenetics*, 11: 757-764, 2001.
- ROSS, G. M., MCMILLAN, T. J., WILCOS, P.; COLLINS, A. R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications – Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research in 1994. *Mutation Research*, 337: 57-60, 1995.
- ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C. M.; AMORIM, L. M. F.; MACEDO, J. M. B.; MEDINA, R.; NETO, J. F. N.; GALLO, C. V. M.; RIBEIRO PINTO, L. F. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*, 1: 233-240, 2002.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. *Mutagenese Ambiental. Org: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, pp. 201-224, 2003.*
- SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PENARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J. L.; DEL CASTILLO, E.R.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutation Research*, 640: 8-15, 2008.
- SANTOS, R. A.; TEIXEIRA, A. C.; MAYORANO, M. B.; CARRARA, H. H. A.; ANDRADE, J. M.; TAKAHASHI, C. S. Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. *Clinical and Experimental Medicine*, 2009.
- SATA, F.; SAPONE, A.; ELIZONDO, G.; STOCKER, P.; MILLER, V. P.; ZHENG, W.; et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 67: 48-56, 2000.
- SATO, M.; SATO, T.; IZUMO, T.; AMAGASA, T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncology*, 36: 267-271, 2000.
- SCHMID, P.; WISCHNEWSKY, M. B.; SEZER, O.; BÖHM, R.; POSSINGER, K. Prediction of response to hormonal treatment in metastatic breast cancer. *Oncology*, 63: 309-316, 2002.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191, 1988.

- SLAGBROOM, P. E.; VIJG, J. Genetic instability and aging: theories, facts and future perspectives. *Genome*, 31: 373-385, 1989.
- SPURDLE, A. B.; GOODWIN, B.; HODGSON, E.; HOPPER, J. L.; CHEN, X.; PURDIE, D. M.; MCCREDIE, M. R. E.; GILES, G. G.; CHENEVIX-TRENCH, G.; LIDDLE, C. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics*, 12 (5): 355-366, 2002.
- SPEIT, G. 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. 1995.
- SU, H. I.; SAMMEL, M. D.; VELDERS, L.; HORN, M.; STANKIEWICZ, C.; MATRO, J.; GRACIA, C. R.; GREEN, J.; DEMICHELE, A. Association of cyclophosphamide drug-metabolizing enzyme polymorphisms and chemotherapy-related ovarian failure in breast cancer survivors. *Fertility and Sterility*, article in press, 2009.
- SUBRAMANIAM, D. S.; ISAACS, C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 6: 147-159, 2005.
- TANAKA-KAGAWA, T.; JINNO, H.; HASEGAWA, T.; MAKINO, Y.; SEKO, Y.; HANIOKA, N.; ANDO, M. Functional characterization of two variant human GSTO1 - 1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301: 516-520, 2003.
- TAYEB, M. T.; CLARK, C.; AMEYAW, M. M.; HAITES, N. E.; EVANS, D. A.; TARIQ, M.; MOBAREK, A.; OFORI-ADJEI, D.; MCLEOD, H. L. CYP3A4 promoter variant in Saudi, Ghanaian and Scottish Caucasian populations. *Pharmacogenetics*, 10: 753-756, 2000.
- TICE, R. R. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips, D.H. e Venitt, S. eds. *Environmental Mutagenesis*, Oxford: Bios Scientific Publishers, pp. 315-339, 1995.
- TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J. -C.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. *Mutation Research*, 35: 206-221, 2000.
- TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M. and SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. *Mutation Research*, 338: 85-95, 1997.
- TOMCZYKOWSKI, J.; SZUBSTARSKI, F.; KURYLICIO, L.; STANISLAWEK, A.; BARYCKI, J.; BARANOWSKI, W. Does the degree of cell lesion in breast cancer after inductive chemotherapy have any prognostic value? *Acta Oncologica*, 38: 949-953, 1999.
- TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 22: 7369-7375, 2003.
- TRUDEAU, M.; SINCLAIR, S. E.; CLEMONS, M. Breast Cancer Disease Site Group. Neoadjuvant taxanes in the treatment of non-metastatic breast cancer: a systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, 31(4): 283-302, 2005.
- TUCKER, A. N.; TKACZUK, K. A.; LEWIS, L. M.; TOMIC, D.; LIM, C. K.; FLAWS, J. A. Polymorphisms in cytochrome P4503A5 (CYP3A5) may be associated with race and tumor characteristics, but not metabolism and side effects of tamoxifen in breast cancer patients. *Cancer Letters*, 217: 61-72, 2005.
- TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research*, 365: 147-159, 1996.

- VAGHEF, H.; NYGREN, P.; EDLING, C.; BERGH, J.; HELLMAN, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutation Research*, 395:127-138, 1997.
- VAN POZNAK, C.; TAN, L.; PANAGEAS, K. S.; ARROYO, C. D.; HUDIS, C.; NORTON, L.; SEIDMAN, A. D. Assessment of molecular markers of clinical sensitivity to single-agent taxane therapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20: 2319-2326, 2002.
- VARGA, D.; HOEGEL, J.; MAIER, C.; JAINTA, S.; HOEHNE, M.; PATINO-GARCIA, B.; MICHEL, I.; SCHWARZ-BOEGER, U.; KIECHLE, M.; KREIENBERG, R.; VOGEL, W. On the difference of micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes between breast cancer patients and controls. *Mutagenesis*, 21 (5): 313-320, 2006.
- VALVERDE, M.; LOPEZ, M.; LOPEZ, I.; SANCHEZ, I.; FORTOUL, T. I.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; ROJAS, E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30:147-152, 1997.
- WALKER, A. H.; JAFFE, J. M.; GUNASEGARAM, S.; CUMMINGS, S. A.; HUANG, C. S.; CHERN, H. D.; OLOPADE, O. I.; WEBER, B. L.; REBBECK, T. R. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. *Mutations in brief no.191*. Online. *Human Mutation*, 12: 289, 1998.
- WANG, J.; BUCHHOLZ, T. A.; MIDDLETON, L. P.; ALLRED, D. C.; TUCKER, S. L.; KUERER, H. M.; ESTEVA, F. J.; HORTOBAGYI, G. N.; SAHIN, A. A. Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 94: 3107-3114, 2002.
- WENZEL, C.; BARTSCH, R.; HUSSIAN, DAGMAR.; PLUSCHNIG, U.; ALTORJAI, G.; ZIELINSKI, C. C.; LANG, A.; HAID, A.; JAKESZ, R.; GNANT, M.; STEGER, G. G. Invasive ductal carcinoma and invasive lobular carcinoma of breast differ in response following neoadjuvant therapy with epidoxorubicin and docetaxel + G-CSF. *Breast Cancer Research and Treatment*, 104:109-114, 2007.
- WESTLIND, A.; LÖFBERG, L.; TINDBERG, N.; ANDERSSON, T. B.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259: 201-205, 1999.
- WHITBREAD, A. K.; TETLOW, N.; EYRE, H. J.; SUTHERLAND, G. R.; BOARD, P. G. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics*, 13: 131-144, 2003.
- WILLIAMS, J. A.; PHILLIPS, D. H. Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Research*, 60: 4667-4677, 2000.
- WOOSTER, R.; WEBER, B. L. Breast and Ovarian Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348; 23: 2339-2347, 2003.
- ZHANG, X.; LIU, Z. H.; ZHENG, J. M.; CHEN, Z. H.; TANG, Z.; CHEN, J. S.; LI, L. S. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. *Clinical Transplantation*, 19: 638-643, 2005.

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](#)