



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLODOALDO ZAGO CAMPOS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DAS ENZIMAS
DE METABOLIZAÇÃO *GSTM1*, *GSTT1* E *NQO1*:
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA SUSCETIBILIDADE,
PROGNÓSTICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA A CURTO
PRAZO DO CÂNCER DE MAMA**

CLODOALDO ZAGO CAMPOS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DAS ENZIMAS
DE METABOLIZAÇÃO *GSTM1*, *GSTT1* E *NQO1*:
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA SUSCETIBILIDADE,
PROGNÓSTICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA A CURTO
PRAZO DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Tânia Longo Mazzuco.
Co-orientadora: Dra. Maria Angelica E. Watanabe.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C198a Campos, Clodoaldo Zago.

Análise de polimorfismos genéticos das enzimas de metabolização *GSTMI*, *GSTTI* e *NQOI* : possíveis implicações na suscetibilidade, prognóstico e resposta terapêutica a curto prazo do câncer de mama. – Londrina, 2014.
64 f. il.

Orientador: Tânia Longo Mazzuco.

Coorientador: Maria Angélica Ehara Watanabe.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Mamas – Câncer – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) – Teses. 3. Enzimas – Teses. 4. Glutaciona – Teses. 5. Quinona – Teses. I. Mazzuco, Tânia Longo. II. Watanabe, Maria Angélica Ehara. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616-006 6

CLODOALDO ZAGO CAMPOS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DAS ENZIMAS DE
METABOLIZAÇÃO *GSTM1*, *GSTT1* E *NQO1*:
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA SUSCETIBILIDADE, PROGNÓSTICO E
RESPOSTA TERAPÊUTICA A CURTO PRAZO DO CÂNCER DE
MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de março de 2014.

DEDICO

"Dedico este trabalho a todos os pacientes vítimas de câncer, em especial àqueles que tiveram por ele suas vidas ceifadas precocemente."

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, senhor do meu destino, sempre presente, principalmente nos momentos mais difíceis. Agradeço imensamente a todos os pacientes que contribuíram com esta pesquisa e um agradecimento especial aos voluntários, que altruisticamente formaram o grupo controle. Agradeço as minhas orientadoras, Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco e Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe, pela oportunidade que me proporcionaram de cursar esta pós-graduação e pela forma sempre serena nas suas atitudes, o que tornou esta caminhada muito menos árdua. Agradeço de forma especial a Profa. Dra Roberta Losi Guembarovski pelo seu apoio, pelas suas inestimáveis e decisivas colaborações e por ter aceito o convite para compor a banca examinadora. Agradeço também a Profa. Dra Estefânia Gastaldello Moreira por também ter aceitado o convite para compor a banca examinadora abrilhantando-a e enriquecendo este trabalho com suas oportunas ponderações. Agradeço a grande colaboração do Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira, da Profa. Dra. Julie Massayo Maeda Oda e da Profa. Me. Bruna Karina Banin Hirata, além de todos os demais membros do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia da Universidade Estadual de Londrina. Agradeço a senhora Nilse Teresinha Kronbauer, técnica de enfermagem da Autarquia Municipal de Saúde de Londrina, que teve papel fundamental na seleção e coleta de material do grupo controle. Agradeço o Hospital do Câncer de Londrina, a Prefeitura Municipal de Londrina e o Hospital Universitário de Londrina que através de seus comitês e comissões, aprovaram a realização deste estudo em suas dependências. Agradeço a todos os funcionários destas instituições que em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho. Não poderia esquecer de agradecer a todos os professores e coordenadores do programa de pós-graduação pelo empenho e carinho para com os alunos. Agradeço as agências fomentadoras e por fim agradeço a minha esposa pelo constante apoio e as minhas filhas o meu sentido de viver.

CAMPOS, Clodoaldo Zago.. **Análise de polimorfismos genéticos das enzimas de metabolização *GSTM1*, *GSTT1* e *NQO1***: possíveis implicações na suscetibilidade, prognóstico e resposta terapêutica a curto prazo do câncer de mama. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2014.

RESUMO

Câncer de mama, doença incomum antes dos 35 anos, mas de incidência crescente após esta idade, é a principal neoplasia entre as mulheres no mundo. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima para 2014 o surgimento de 57.120 novos casos com 13.225 óbitos. Durante a evolução, a espécie humana se tornou capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos que podem causar danos à saúde. O equilíbrio entre as taxas de absorção e eliminação destes compostos tem um papel importante na prevenção de danos no DNA e, conseqüentemente, no desenvolvimento tumoral. Polimorfismos em enzimas que promovem conjugação, fundamentais na homeostasia celular, como as glutathione-S-transferases (GSTs), e seu papel na suscetibilidade a diversas neoplasias têm sido extensivamente investigados. Dentre os genes desta superfamília mais investigados encontram-se *GSTM1* e *GSTT1*, os quais são polimórficos por deleção. As quinonas são uma classe de compostos orgânicos derivados de hidrocarbonetos aromáticos, encontradas em vários sistemas biológicos. Envolvida no metabolismo das quinonas, a enzima NAD(P)H:quinonaoxidoredutase 1 (*NQO1*) é uma redutase que participa na proteção contra efeitos tóxicos de drogas anti-cancerígenas, realiza a ativação de certas quinonas antitumorais e está envolvida na defesa contra formas reativas de oxigênio. O gene que codifica para esta enzima (*NQO1*) possui um polimorfismo genético de base única (C609T) (rs1800566) que ocasiona a perda de sua função. Como as enzimas codificadas pelos genes acima descritos são importantes para a homeostasia celular, torna-se claro que a ausência ou diminuição de suas atividades pode levar a um aumento na toxicidade e na suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores malignos, como aqueles da mama. Dentro deste contexto, este trabalho objetivou analisar mutações nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *NQO1* em pacientes com câncer de mama e em controles livres de neoplasia mamaria na busca por marcadores relacionados à suscetibilidade, prognóstico e resposta terapêutica. Amostras de sangue periférico de 121 pacientes com diagnóstico confirmado e de 151 controles, tiveram seus DNAs genômicos extraídos e amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex ou seguida por análise do fragmento de restrição (RLFP). Os resultados foram analisados em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata. A análise do estudo de associação foi realizada através do cálculo da *Odds Ratio* (OR), com Intervalo de Confiança a 95% (IC=95%) e para a comparação entre os parâmetros histopatológicos, clínicos, de prognóstico e terapia com os dados genéticos foram utilizados os testes Qui-Quadrado de *Pearson* e correlação de *Spearman*. O estudo de associação caso-controle não indicou associações positivas ou negativas entre a presença das variantes polimórficas e a suscetibilidade ao câncer de mama. Também não foram observadas diferenças nas distribuições genotípicas quando foram avaliados os parâmetros prognósticos (grau nuclear, tamanho de tumor, presença de metástase em linfonodo e/ou à distância e subtipos caracterizados

segundo o perfil de imunohistoquímica). Adicionalmente, os parâmetros relacionados com resposta terapêutica (sobrevida e recidiva) também não demonstraram resultados significativos após um período de seguimento a curto prazo (18 meses). Deste modo, na amostra do presente trabalho, os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *NQO1* não se mostraram candidatos a marcadores moleculares de suscetibilidade, prognóstico ou sobrevida no câncer de mama.

Palavras chave: Câncer de mama. Polimorfismos genéticos. *GSTM1*. *GSTT1*. *NQO1*. Suscetibilidade. Prognóstico. Sobrevida.

CAMPOS, Clodoaldo Zago. **Analyses of genetic polymorphisms of the metabolizing enzymes *GSTM1*, *GSTT1* and *NQO1***: possible implication susceptibility, prognostic and short-term therapeutic response of breast cancer. 2014. 64 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil, 2014.

ABSTRACT

Breast cancer, an uncommon disease before 35 years, but of increasing incidence after this age, is the leading neoplasia between women worldwide. In Brazil, the Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimates by 2014 the onset of 57,120 new cases with 13,225 deaths. During evolution, human species has become able to metabolize a large number of chemical compounds that accumulate in cells and may cause damage to health. The balance between absorption and elimination rates has a pivotal role in the prevention of DNA damage and, consequently, in tumor development. Genetic polymorphisms in enzymes that promote conjugation, essential in cell homeostasis, such as Glutathione-S transferases (GSTs), and its role in susceptibility to various cancers, has been widely investigated. Among most investigated genes of this superfamily are *GSTM1* and *GSTT1*, which are polymorphic by deletion. Quinones are a class of organic compounds derivatives of aromatic hydrocarbons found in many biological systems. Engaged in the metabolism of quinones, NAD(P)H enzyme: quinonaoxidoreductase 1 (*NQO1*) is a reductase that protects against toxic effects of anti-cancer drugs. *NQO1* gene has a single nucleotide polymorphism (C609T) that leads to a reduced enzyme activity. As the enzymes encoded by these genes hold an important function in cellular homeostasis, it is clear that absence or reduction of their activities may lead to increased toxicity and susceptibility to development of malignant tumors, such as those of breast. In this context, this study aimed to analyze mutations on genes *GSTM1*, *GSTT1*, *NQO1* in patients with breast cancer and breast cancer-free controls, in the search for markers related to susceptibility, prognostic and therapeutic response for breast cancer. Peripheral blood samples from 121 patients with confirmed diagnosis and 151 controls had their genomic DNA extracted, and amplified by methods based on polymerase chain reaction (PCR). Results were analyzed on 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Analysis of the association study was performed by calculating Odds Ratio (OR) with 95% confidence interval (CI = 95 %) and comparison between histopathological, clinical, prognostic and therapeutic parameters was performed using the chi-square test and the Spearman correlation coefficient. Case-control study did not indicate positive or negative associations between the presence of polymorphic variants and breast cancer susceptibility. Any differences were observed in genotype distribution when prognostic parameters were analyzed (nuclear grade, tumor size, presence of lymph node and/or distant metastasis and subtypes characterized according to the immunohistochemical profile). Additionally, the parameters related to therapeutic response (survival and recurrence) also showed no significant results after short period of follow-up (18 months). Thus, in this sample, *GSTM1*, *GSTT1* and *NQO1* genes were not candidates for molecular markers of susceptibility, prognostic and survival in breast cancer.

Key words: Breast cancer. Genetic polymorphisms. *GSTM*. *GSTT*. *NQO1*. Susceptibility. Prognostic. Survival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Perfil eletroforético para os polimorfismos dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	29
Figura 2 –	Perfil eletroforético para o polimorfismo rs1800566 do gene <i>NQO1</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Iniciadores e condições de amplificação para os genes candidatos (<i>NQO1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>)	29
-------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
µmol	Micromolar
°C	Graus Celsius
<i>CYP1A1*2</i>	Gene 1A1 alelo 2A do citocromo P450
A	
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<i>FANCD2</i>	Proteína D2 da anemia de Fanconi
<i>FISH</i>	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
GSTs	Glutathione S-Transferases
<i>GSTM1</i>	Gene M1 da família das Glutathione S-transferases
<i>GSTT1</i>	Gene T1 da família das Glutathione S-transferases
<i>HER2</i>	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano tipo 2
<i>IARC</i>	Agencia Internacional para Pesquisa sobre Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	Cloreto de Potássio
Ki67	Antígeno Ki67
LEAP	Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NQO1	NAD(P)H: quinona oxido-redutase 1
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomolar
RE	Receptor de estrógeno
RFLP	Tamanho do Fragmento do Comprimento de Restrição
RP	Receptor de progesterona

<i>SNPs</i>	Polimorfismos de nucleotídeo único
TNM	Tumor-Nódulo-Metástase
<i>TP53</i>	Gene Supressor Tumoral p53 (humano)
U	Unidade
UICC	União Internacional de Controle ao Câncer
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O CÂNCER DE MAMA.....	15
1.2	TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA	16
1.3	ENZIMAS DE METABOLIZAÇÃO E SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER.....	18
1.4	SUPERFAMÍLIA DAS GLUTATIONA S-TRANSFERASE - GENES GSTM1 E GSTT1.....	20
1.5	FAMÍLIA DAS NAD(P)H OXIREDUCTASES – GENE NQO1.....	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	26
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.3	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	27
3.4	EXTRAÇÕES DE DNA GENÔMICO.....	27
3.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	27
3.6	ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA EM HOMOZIGOSE DOS GENES GSTM1 E GSTT1.....	28
3.7	ANÁLISE DO POLIMORFISMO RS1800566 DO GENE NQO1	30
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	31
4	RESULTADOS	32
	ARTIGO CIENTIFICO - “Polimorfismos nos genes GSTM1, GSTT1 e NQO1 não estão associados à suscetibilidade, prognóstico e sobrevida nas pacientes portadoras de câncer de mama”	33

5	CONCLUSÕES.....	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO	63
ANEXO A -	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos	64

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença associada a alterações genéticas múltiplas, que se origina a partir de uma célula normal que acumulou mutações após sucessivas divisões celulares num processo de evolução clonal (Cavenee and White 1995). Em geral, as mutações incluem alterações de sequência, perdas, ganhos e rearranjos em diversos genes, a maioria relacionadas ao controle e progressão do ciclo celular (Koch and Nasmyth 1994).

Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais (Perera 1997). Cerca de 5% a 10% são hereditários, provenientes de mutações que são transmitidas através da linhagem germinativa (Fearon 1997). Dessa forma, o câncer é uma doença genética e a identificação e a caracterização dos genes envolvidos na sua origem e progressão é fundamental para a compreensão das bases moleculares da doença (Parmigiani and Camargo 2004).

O surgimento e a progressão neoplásica são caracterizados por alterações em dois grupos principais de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (Chang, Syrjanen et al. 1995; Hanahan and Weinberg 2000). Genes associados aos mecanismos de reparo aos danos do DNA são considerados como um terceiro grupo, que pode atuar direta ou indiretamente no processo da carcinogênese (Hoeijmakers 2001).

Os proto-oncogenes são genes celulares normais que atuam no controle positivo do crescimento e diferenciação celular (Irish and Bernstein 1993). Podem tornar-se oncogenes por meio de mutações resultantes da exposição aos carcinógenos, radiação ou através de infecções virais. A ativação desses genes ocorre por translocações cromossômicas, amplificações gênicas ou mutações de ponto, e alterações em um único alelo são suficientes para a transformação maligna da célula. Como consequência levam a uma proliferação celular anormal, podendo resultar na transformação tumoral (Knudson 1985).

Os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação celular (Knudson 1985). As proteínas codificadas por eles fazem parte das vias de sinalização celular, retardando a progressão do ciclo, bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte celular programada. Conseqüentemente,

alterações genéticas que inativam estes genes poderiam levar à proliferação desordenada, característica das células cancerosas (Weinberg 1991).

O câncer de mama é o tumor maligno mais diagnosticado em mulheres, com mais de um milhão de casos relatados anualmente em todo o mundo (Yuan, Xu et al. 2011), o que tem levado a comunidade científica a desenvolver inúmeros estudos na busca por uma compreensão dos mecanismos envolvidos nesta neoplasia.

1.1 O CÂNCER DE MAMA

Câncer de mama, doença incomum antes dos 35 anos, mas de incidência crescente após esta idade, é a principal neoplasia entre as mulheres no mundo, tendo sido projetado pela *International Agency For Research on Cancer* (IARC), para o ano de 2012, a incidência de 1.676.633 casos, levando a morte 521.817 mulheres. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima para 2014 o surgimento de 57.120 novos casos e o óbito de 13.225 mulheres.

Cerca de 98% das neoplasias malignas da mama são carcinomas, na sua grande maioria de origem nos ductos e uma pequena proporção nos lóbulos (Bergh, Jonsson et al. 2001). Após o diagnóstico definitivo que se dá através de biópsia, para o manejo clínico é levado em consideração a classificação histopatológica, de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (WHO), o estadiamento baseado no Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) (Beahrs, Rubin *et al.*, 1977; INCA/MS, 2007), dados moleculares que podem ser obtidos por imunohistoquímica ou testes genéticos e dados clínicos como idade, comorbidades e *status* menopausal, além da preferência da própria paciente.

O sistema TNM classifica as pacientes portadoras de carcinoma invasor em quatro grupos, denominados estágio I, II, III e IV. Pacientes em estágio I e II são consideradas portadoras de doença em fase inicial. Estágio III, de um modo geral, trata-se de doença localmente avançada. Doença em estágio IV apresenta metástase à distância. Nos Estados Unidos, de acordo com o *National Cancer Institute*, 61% dos casos de câncer de mama se apresentam com a doença localizada, levando a uma sobrevida de 98,6% em 5 anos. Já a doença metastática corresponde a 5% dos casos e a sobrevida em 5 anos é de apenas 24,3%.

Os dados moleculares permitem dividir o carcinoma invasor em 4 subtipos, com diferente história natural e resposta ao tratamento. Esta classificação leva em consideração o *status* dos receptores hormonais, a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) e o marcador de proliferação celular Ki67, sendo que este último pode ser substituído pelo grau tumoral para diferenciação dos subtipos luminal A e B no caso da sua não disponibilização de forma confiável (Goldhirsch, Wood et al. 2011). Os 4 subtipos são Luminal A, de melhor prognóstico, definido como receptor de estrógeno (RE) e ou progesterona (RP) positivo, HER2 não superexpresso e Ki67 baixo (<14%). Luminal B possui prognóstico intermediário, com RE e ou RP positivo e Ki67 alto (>14%). Não luminal apresenta HER2 superexpresso e receptores hormonais negativos e por fim o subtipo Triplo-negativo que possui receptores hormonais negativos e HER2 não superexpresso (Goldhirsch, Wood et al. 2011).

1.2 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Conceitualmente, o tratamento do câncer de mama inclui o controle da doença local com cirurgia, radioterapia ou ambos, e o tratamento da doença sistêmica com quimioterapia, terapia endócrina, terapia biológica ou a combinação destes. A escolha, tanto do tratamento local como sistêmico, leva em consideração os dados citados anteriormente. Para pacientes que se apresentam com doença operável ao diagnóstico, ou seja, estágio I e II, e alguns casos selecionados de estágio IIIA, o tratamento inicial normalmente é cirúrgico, de preferência conservador, ou seja ressecção com margem segura apenas da lesão tumoral, seguido de radioterapia adjuvante, sem perda da eficácia em relação a mastectomia radical (Arriagada, Le et al. 1996; Fisher, Anderson et al. 2002; Veronesi, Cascinelli et al. 2002; Clarke, Collins et al. 2005).

Estudos mais recentes têm também trazido avanços em relação a uma abordagem mais conservadora da axila. Previamente, a axila era tratada rotineiramente de forma radical, com esvaziamento da cadeia linfonodal, levando a importante comorbidade, podendo chegar a incapacidade física do membro superior ipsilateral. Isto levou ao desenvolvimento da técnica de pesquisa do linfonodo sentinela, que permitiu evitar a dissecação axilar nas pacientes negativas, porém manteve o esvaziamento axilar no caso de linfonodo sentinela positivo (Veronesi,

Paganelli et al. 2003; Mansel, Fallowfield et al. 2006). O estudo *ACOSOG Z0011* para pacientes com axila clinicamente negativa que irão ser submetidos a cirurgia conservadora da mama seguido de radioterapia adjuvante mostrou, em um seguimento médio de 6,3 anos, que dissecação da axila pode ser omitida sem afetar adversamente o prognóstico, mesmo nos casos com a presença de um ou dois linfonodos sentinela positivo (Giuliano, Hunt et al. 2011; Goldhirsch, Wood et al. 2011).

Já o tratamento sistêmico adjuvante tem a finalidade de tratar micrometástases e a seleção das candidatas, assim como do tratamento, se baseia no risco individual de recidiva, que leva em consideração os dados anatomopatológicos, as características biológicas do tumor e os dados clínicos. São consideradas pacientes com alto risco de recidiva as que possuem uma das seguintes características: tumor maior do que 2 cm, linfonodos axilares positivos, idade menor do que 35 anos, receptor hormonal negativo e HER2 positivo. As pacientes com este perfil de doença podem ser tratadas com quimioterapia adjuvante (Goldhirsch, Wood et al. 2011). Pacientes consideradas de baixo risco de recidiva possuem tumor menor do que 1 cm, linfonodos axilares negativos e subtipo luminal A. Tais pacientes podem ser tratadas apenas com terapia endócrina adjuvante. Pacientes que não se encontram nas duas categorias acima são consideradas de risco intermediário e a indicação de quimioterapia adjuvante deve ser individualizada. Para ajudar na tomada de decisão, há disponível no mercado testes que analisam painéis de genes e de acordo com a sua expressão o risco de recidiva é estabelecido (Paik, Tang et al. 2006; Knauer, Mook et al. 2010).

Independente do tratamento local ou dos demais tratamentos sistêmicos, a terapia endócrina deve ser oferecida a todas as pacientes que possuem tumores com receptor hormonal positivo. O benefício deste tratamento já está bem estabelecido na literatura médica, com redução de 31% na taxa de morte anual por câncer de mama nestas pacientes (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005). E por fim, merece destaque o tratamento sistêmico adjuvante dos tumores HER2 positivo. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana com atividade de tirosina kinase que está envolvida na diferenciação, adesão e mobilidade celular. Esta glicoproteína é produzida pelo proto-oncogene *c-erbB2/HER2/neu*, cuja detecção aumentada, a nível molecular ou protéico, confere pior prognóstico (Lin, Chen et al. 2010). A superexpressão da proteína pode ser

demonstrada pela imuno-histoquímica ou pela amplificação do gene por FISH (Hibridização *in situ* por fluorescência) (Sobin and Wittekind 2002). Aproximadamente 25% dos tumores possuem a superexpressão desta glicoproteína. A droga denominada trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado com especificidade para o domínio extracelular do HER2, tem comprovado benefício clínico para esta população de pacientes. Estudos clínicos multicêntricos randomizados como o NSABP-B31, NCCTG N9831 demonstraram uma redução no risco de recorrência de 48% e uma redução de 39% no risco de morte com o uso de trastuzumabe por 12 meses em pacientes com tumores maior do que 1 cm e HER2 superexpresso, independente das demais características (Perez, Romond et al. 2011).

Nas pacientes que se apresentam com tumores localmente avançado, ou seja, estágio clínico III, que necessitam redução tumoral para realização de cirurgia com finalidade curativa e em casos selecionados de estágio II, em que se deseja fazer uma cirurgia mais conservadora, está indicado o tratamento neoadjuvante, visto que foi demonstrado em estudo clínico randomizado, não haver diferença de sobrevida se comparado com tratamento adjuvante (Fisher, Bryant et al. 1998). Com raras exceções, nestes casos o tratamento de escolha é quimioterapia citotóxica. Nas pacientes com HER2 positivo, está indicado a associação do trastuzumabe à quimioterapia, visto demonstração de aumento na taxa de resposta patológica completa variando entre 26% a 65,2% (Buzdar, Ibrahim et al. 2005).

Pacientes portadoras de doença metastática são tratadas sistemicamente com finalidade paliativa, visando controle dos sintomas e aumento da sobrevida, sendo reservado tratamento cirúrgico e radioterápico para situações especiais. Apesar do tratamento sistêmico aumentar a sobrevida e promover controle dos sintomas, ele não é curativo e deve ser o menos tóxico possível. Os tratamentos disponíveis são os mesmos citados acima para a adjuvância, ou seja, quimioterapia, hormonioterapia e drogas biológicas.

1.3 ENZIMAS DE METABOLIZAÇÃO E SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER

Muitas doenças complexas são determinadas por três fatores principais: o estilo de vida do indivíduo, a exposição ambiental e a suscetibilidade

genética intrínseca. Estudos epidemiológicos estimam que mais de 90% de todos os tumores malignos estão relacionados a fatores ambientais (Lichtenstein, Holm et al. 2000; Scully, Field et al. 2000). Dentro deste contexto, a suscetibilidade individual ao câncer pode resultar de alterações polimórficas em genes do reparo a danos do DNA, supressores tumorais, proto-oncogenes, ou ainda, aqueles relacionados ao metabolismo de drogas e xenobióticos (compostos exógenos) (Hatagima 2002).

O metabolismo é o principal mecanismo para manter a homeostasia durante a exposição dos organismos aos xenobióticos. Durante a evolução, a espécie humana se tornou capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos que podem causar danos para a saúde. O equilíbrio entre as taxas de absorção e eliminação tem um papel importante na prevenção de danos no *DNA* (Hatagima 2002), e conseqüentemente, no desenvolvimento tumoral.

Inúmeras variações no metabolismo individual têm sido relacionadas a variantes em genes que codificam enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de carcinógenos químicos. Tais variações são atribuídas à presença de polimorfismos genéticos, que são definidos como a ocorrência de variações genéticas em uma população, com duas ou mais formas descontínuas de um determinado fenótipo, em tal proporção que o mais raro deles apresente uma frequência superior a 1% na população normal, e os quais, muitas vezes, estão associados à suscetibilidade a determinados tipos tumorais. Assim, torna-se de crucial importância identificar quais destas variantes estão envolvidas na etiologia do câncer (Hatagima 2002; Wunsch Filho and Zago 2005), incluindo os tumores malignos da mama.

Adicionalmente, evidências sugerem que polimorfismos, especialmente de nucleotídeo único (SNPs), presentes em genes que codificam enzimas envolvidas com a metabolização de xenobióticos, o que inclui os quimioterápicos, poderiam influenciar na toxicidade e na resposta ao tratamento dos pacientes. Segundo Shastry (2006), variações inter-individuais na resposta ao tratamento de pacientes com câncer se constituem num problema de saúde pública e não existem até o momento biomarcadores que possam prever qual grupo responderá positivamente e quais indivíduos não irão responder ou sofrerão os efeitos adversos da presença das drogas no organismo, o que torna o estudo destes genes de grande valia para a oncologia.

Dentre as variantes genéticas do metabolismo de xenobióticos que têm sido associadas de forma mais consistente com o aumento do risco de câncer inclui-se aquelas da família das glutathiona S-transferases (GSTs) e das NAD(P)H oxireduases (*NQO1*).

1.4 SUPERFAMÍLIA DAS GLUTATIONA S-TRANSFERASE - GENES *GSTM1* E *GSTT1*

Polimorfismos de enzimas que promovem conjugação na fase II do metabolismo, como as GSTs, e seu papel na suscetibilidade a diversas neoplasias têm sido extensivamente investigado (Cascorbi 2006). Dentre as enzimas de fase II, as GSTs desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com moléculas endógenas, como as glutathionas, como por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos presentes, por exemplo, na fumaça do cigarro e na dieta alimentar, impedindo a ligação destes com o DNA (Hayes and Pulford 1995).

Estima-se que existam pelo menos 20 GSTs na espécie humana, que estão presentes na maioria das espécies (Buetler and Eaton 1992). A família destas enzimas é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais, que podem se conjugar a moléculas eletrofílicas tornando-as menos tóxicas (Persson, Johansson et al. 1995). Sua maior concentração é observada no fígado, contudo, é encontrada também em outros órgãos, como pulmões e intestino delgado. As GSTs humanas foram agrupadas com base em seu ponto isoelétrico e na seqüência de aminoácidos, em alfa (básicas), mu (próximas ao *pH* neutro) e teta (ácidas), cada uma contendo produtos de diferentes locos gênicos (Hayes and Pulford 1995).

Dentre os genes desta superfamília mais conhecidos encontram-se o *GSTM1* e *GSTT1*. O gene *GSTM1*, localizado no cromossomo 1, é polimórfico possuindo 3 variantes, sendo dois alelos funcionais (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) e um alelo com atividade nula por deleção (*GSTM1*0*), sendo que os alelos funcionais possuem a mesma eficácia de detoxificação (Widersten, Pearson et al. 1991). O gene *GSTT1*, localizado no cromossomo 22, também é polimórfico, podendo apresentar fenótipo nulo por deleção. A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em frequências que variam de 20 a 70% nas diferentes populações, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38% (Arruda, Grignolli et al. 1998).

Como as enzimas codificadas por esses genes realizam um importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a ausência de sua atividade pode levar a um aumento na toxicidade e na suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores malignos (Cascorbi 2006), como aqueles da mama. Diversos estudos detectaram uma frequência elevada do genótipo nulo para estes dois genes em indivíduos portadores de diferentes neoplasias, principalmente os cânceres de pulmão, bexiga e cavidade bucal (Au, Oh et al. 2001). Olshan e colaboradores (2000) demonstraram um aumento no risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos portadores de deleções do gene *GSTT1*. A deleção do gene *GSTM1* também vem sendo correlacionada a outras doenças associadas ao hábito tabagista, como arteriosclerose (Olshan, Li et al. 2003) e enfisema pulmonar (Cascorbi 2006).

Pesquisadores brasileiros analisaram mutações polimórficas em diferentes genes envolvidos com metabolização de estrogênio e de xenobióticos, incluindo *GSTM1* e *GSTT1*, em uma amostra de mulheres brasileiras (Torresan, Oliveira et al. 2008). Os autores observaram que um membro da família das glutationsas, o gene *GSTP1* (glutathione P1) foi positivamente associado ao câncer de mama e que combinações de genótipos de risco também se mostraram positivamente associadas ao desenvolvimento tumoral maligno. Entretanto, não foram observadas correlações significativas quando os diferentes genótipos foram analisados em relação a parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes (comprometimento de linfonodos, grau nuclear e tamanho de tumor).

Uma vez que a carcinogênese é influenciada por vários genes, uma única variante polimórfica possui, individualmente, um efeito pequeno, mas o risco populacional atribuído aos genes considerados de suscetibilidade pode ser significativa, justificando a realização da análise de variantes simultaneamente (Norppa 2003). Segundo Kadlubar (2001) o impacto de um único polimorfismo genético pode ser pequeno ou inexistente, mas a análise de interações entre várias variantes pode evidenciar uma suscetibilidade maior ou menor. Como exemplo destas interações, diversos autores sugeriram uma maior suscetibilidade para indivíduos que possuem uma combinação de genótipos considerados de risco (Autrup 2000; Geisler and Olshan 2001; Gronau, Koenig-Greger et al. 2003), como presença do alelo *CYP1A1*2A* (Citocromo *P4501A1*) e *GSTM1/GSTT1* nulos.

Assim, a identificação de indivíduos mais propensos a acumular mutações poderá, num futuro próximo, conduzir a novas perspectivas para o diagnóstico precoce e a prevenção de determinadas neoplasias. Compreender os mecanismos envolvidos na suscetibilidade herdada poderá motivar também o desenvolvimento de drogas terapêuticas mais específicas (Wunsch Filho and Zago 2005).

Segundo Hashibe (2003) o processo de metabolização de xenobióticos é complexo, envolvendo muitos compostos e um grande número de enzimas. A família das glutathione-S-transferases possui uma ampla variedade de substratos, de modo que a ação enzimática pode variar em diferentes localizações anatômicas. Estas variáveis podem refletir nos resultados controversos da literatura, ressaltando a importância de estudos adicionais.

1.5 FAMÍLIA DAS NAD(P)H OXIREDUCTASES – GENE NQO1

É conhecido que o estresse oxidativo resultante do excesso de espécies reativas de oxigênio e ou deficiências na capacidade antioxidante celular podem desempenhar um papel importante na etiologia do câncer de mama (Hong, Ambrosone et al. 2007). Assim, um balanço entre os oxidantes e antioxidantes endógenos é comumente afetado pela variação nos genes envolvidos com a geração e a remoção das espécies reativas (Cai, Shu et al. 2004; Tamimi, Hankinson et al. 2004).

As quinonas são uma classe de compostos orgânicos derivados de hidrocarbonetos aromáticos, encontradas em vários sistemas biológicos, sendo componentes da cadeia transportadora de elétrons (Monks, Hanzlik et al. 1992; Monks and Jones 2002). Algumas quinonas são utilizadas no tratamento sistêmico do câncer, como exemplo as antraciclinas (doxorubicina) e mitomicina C (Asche 2005). Envolvida no metabolismo das quinonas, a enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) é uma redutase obrigatória de dois elétrons que participa na proteção contra efeitos tóxicos de drogas anticancerígenas, realiza a ativação de certas quinonas antitumorais (Ross, Kepa et al. 2000) e está envolvida na defesa contra formas reativas de oxigênio (Nioi and Hayes 2004).

Esta enzima está implicada na proteção contra o estresse oxidativo e a carcinogênese por catalisar reações bio-redutoras e bio-ativadoras (Siegel, Gustafson et al. 2004; Tseng, Yin et al. 2009), incluindo a estabilização do supressor tumoral *TP53* (Asher, Lotem et al. 2002; Asher, Lotem et al. 2002; Anwar, Dehn et al. 2003). Experimentos com animais *knockout* para esta enzima demonstraram reduzida indução de *p53* e apoptose, e elevada susceptibilidade a tumores induzidos por carcinógenos químicos (Long, Waikel et al. 2000; Iskander, Gaikwad et al. 2005). Neste contexto, alguns pesquisadores sugerem este gene como candidato a susceptibilidade a várias formas de câncer (Yuan, Xu et al. 2011).

O gene que codifica para esta enzima (*NQO1*) possui um polimorfismo genético de base única (C609T) (NCBI dbSNP:rs1800566) localizado no éxon 6, que causa uma mudança na sequência de aminoácidos (Pro187Ser) (Traver, Horikoshi et al. 1992; Ross, Traver et al. 1996; Traver, Siegel et al. 1997). Esta mutação ocasiona a perda de sua função, onde indivíduos heterozigotos (CT) apresentam baixa atividade da enzima, enquanto homozigotos recessivos (TT) não demonstram seus efeitos citoprotetores (Lanciotti, Dufour et al. 2005).

Este polimorfismo tem sido associado ao risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer (Zhang, Schulz et al. 2003; Malik, Zargar et al. 2011; Yuan, Xu et al. 2011), incluindo o de mama. Uma vez que a enzima *NQO1* está relacionada ao metabolismo de drogas antitumorais e a variante alélica rs1800566 modifica sua atividade, foi verificado em um estudo relacionando as alterações na resposta a terapia adjuvante com doxorubicina e ciclofosfamida, com ou sem tamoxifeno, que o genótipo polimórfico TT estava associado com pior evolução clínica e baixa probabilidade de sucesso no tratamento, demonstrando um possível efeito modulador desse polimorfismo na eficácia da terapia adjuvante do câncer de mama (Jamieson, Cresti et al. 2011).

Recentemente foram analisados marcadores de reparo do DNA como possíveis candidatos a novos fatores preditivos e prognósticos, os quais poderiam direcionar estratégias terapêuticas individualizadas para o tratamento do câncer de mama. Em uma análise envolvendo 1240 tecidos tumorais de mama embebidos em parafina, a partir de imunohistoquímica e expressão gênica, eles demonstraram que a detecção simultânea da enzima de reparo *FANCD2* (proteína D2 da anemia de Fanconi) e a atividade enzimática de *NQO1* são marcadores de prognóstico adicionais na patogênese do câncer de mama.

De um modo geral, existe a necessidade de se ampliar os estudos envolvendo marcadores moleculares responsáveis por diferentes etapas do metabolismo de xenobióticos e compostos endógenos, especialmente em subtipos tumorais específicos, como aqueles de mama, e, sobretudo, avaliar a presença destas mutações em relação a parâmetros de prognóstico e resposta terapêutica, escassos na literatura mundial. Com base no que foi exposto, neste trabalho, objetivamos a análise de três variantes genéticas envolvidas no metabolismo endógeno e exógeno, e seu possível envolvimento na carcinogênese mamária.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetivou analisar três polimorfismos genéticos das enzimas de metabolização (*GSTM1*, *GSTT1*, *NQO1*), em pacientes com câncer de mama e em controles livres de neoplasia mamaria, na busca por marcadores envolvidos com o processo de carcinogênese mamária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências genótípicas e/ou alélicas dos genes *NQO1*, *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes e controles;
- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar as diferenças nas distribuições genótípicas entre os dois grupos;
- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar as diferenças na distribuição do conjunto de genótipos considerados de risco (*C/T+T/T* e *GSTM1/GSTT1* nulos) entre os dois grupos;
- Obter os dados clinicopatológicos, de prognóstico, sobrevida e tratamento das pacientes;
- Avaliar a igualdade na distribuição das frequências genótípicas para os três polimorfismos nas pacientes em relação aos parâmetros clinicopatológicos, de prognóstico, sobrevida e tratamento;
- Realizar um estudo de coorte para avaliar a sobrevida a curto prazo das pacientes em relação aos genótipos considerados de risco (*C/T+T/T* e *GSTM1/GSTT1* nulos).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231/Plataforma Brasil No. CAAE 171231134,0000.5231). No Hospital do Câncer de Londrina e em uma Unidade Básica de Saúde de Londrina (UBS Orlando Sestari, Bairro União da Vitória) foram realizadas as entrevistas com cada doadora, pacientes e controles, respectivamente, que receberam as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido, para posterior coleta do material.

Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue periférico (Heparina) e dados clínico patológicos de 121 pacientes com média de idade de $51,59 \pm 11,27$ anos, com diagnóstico clínico e histopatológico confirmado de câncer de mama. Como grupo controle foram coletadas 151 amostras de sangue de mulheres com média de idade de $43,68 \pm 14,38$ anos, sem história de neoplasia de mama atual ou anterior, de acordo com exame clínico e mamografia atualizadas para o momento da coleta. A etnia euro-descendente foi predominante tanto nas pacientes como controles. O período de coleta das pacientes foi de julho de 2010 a setembro de 2011. As amostras controles foram coletadas na mesma região (Londrina/PR).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na primeira etapa do presente estudo foi realizado um estudo de associação caso-controle para comparar a presença dos polimorfismos propostos entre os dois grupos, na busca por marcadores associados a uma maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama. Paralelamente foi realizado um estudo transversal para avaliar a associação da presença dos polimorfismos com os fatores prognósticos: estadiamento clínico, grau nuclear, tamanho do tumor, metástase em linfonodos e subtipos caracterizados segundo o perfil de imunohistoquímica.

Num segundo momento, as pacientes foram avaliadas num estudo de Coorte, por um período de pelo menos 18 meses de seguimento, para a avaliação dos parâmetros de sobrevida e recidiva a curto prazo.

3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica foi realizada com coloração por hematoxilina-Eosina (HE) de rotina, para confirmação do diagnóstico de câncer de mama. A classificação histopatológica dos tumores foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (WHO). O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o sistema TNM (tumor/nódulo/metástase) do câncer (Beahrs, Rubin *et al.*, 1977; INCA/MS, 2007). A análise imunohistoquímica para os marcadores HER2, RE e RP foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital do Câncer de Londrina.

3.4 EXTRAÇÕES DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico das amostras foi extraído a partir de 200 µl de sangue periférico total pelo Kit de Extração *Mini Spin Plus* (BioPur, Curitiba, Paraná, BR) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho *NanoDrop 2000c® Spectrophotometer* (*ThermoScientific, Wilmington, Delaware, EUA*) nos comprimentos de onda 260/280nm.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Neste trabalho, a técnica de PCR foi utilizada para a detecção das variantes alélicas polimórficas dos genes *NQO1*, *GSTM1* e *GSTT1* (Tabela 1). Todas as genotipagens foram realizadas no Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA (LEAP), da Universidade Estadual de Londrina.

3.6 ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA EM HOMOZIGOSE DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1*

A reação de co-amplificação em cadeia pela polimerase foi realizada para análise da presença ou ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* baseada no protocolo de PCR *Multiplex* de Abdel-Rahman (1996), modificado, nas seguintes condições: tampão da enzima (20 mM de tris-HCl *pH* 8,4; 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂; 10 pmol de cada iniciador; 1,25 U de Taq DNA polimerase; 2 mM de dNTPs; 100 ng de DNA genômico total e água ultra-pura estéril para completar o volume final de 25 µl.

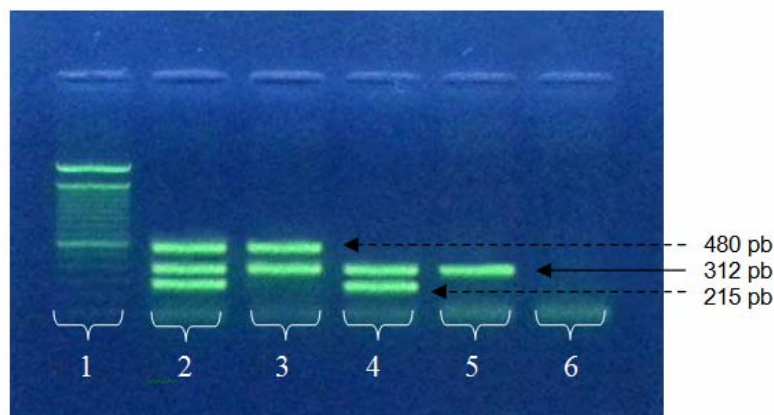
Os fragmentos foram amplificados em termociclador PTC-100 (*MJ Research, Inc*) e submetidos à eletroforese (3V/ml) em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata. Para a confirmação do tamanho dos produtos amplificados, foram utilizados marcadores de DNA (*Ladder*) de 100 pares de base (pb).

Foi usado como controle interno da reação o gene *CYP1A1*. Os iniciadores para este gene amplificam um fragmento não polimórfico de 312 pb (Tabela 1). Os fragmentos de 215 e 480 pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos. A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene ou para ambos (Figura 1).

Tabela 1 – Iniciadores e condições de amplificação para os genes candidatos (*NQO1*, *GSTM1* e *GSTT1*)

Gene	Iniciadores	Condições da reação
<i>NQO1</i> (C>T)	5'AAGCCCAGACCAACTTCT3' 5'ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG 3'	94°C - 5min 40 ciclos (94°C-1 min, 56°C- 1 min, 72°C-2 min) 72°C-10 min
	<i>GSTM1:</i> 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' e 5'GTTGGGCTAAATATACGGTGG3'	
<i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> (deleção)	<i>CYP1A1:</i> 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'	94°C-5 min 30 ciclos (94°C-1 min, 59°C- 1 min, 72°C-1 min) 72°C-5 min
	<i>GSTT1:</i> 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3' 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'	
Enzima de restrição <i>Hinf</i> I	Sequência de clivagem 5'G↓ANTC 3'	Condições de reação 37°C por 3 horas

Figura 1 – Perfil eletroforético para os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. 1) marcador de tamanho fragmento de 100pb (*Ladder*); 2) genótipos *GSTT1/GSTM1* positivos; 3) genótipo *GSTT1* positivo; 4) genótipo *GSTM1* positivo; 5) genótipo duplo negativo; 6) controle interno da reação (branco).

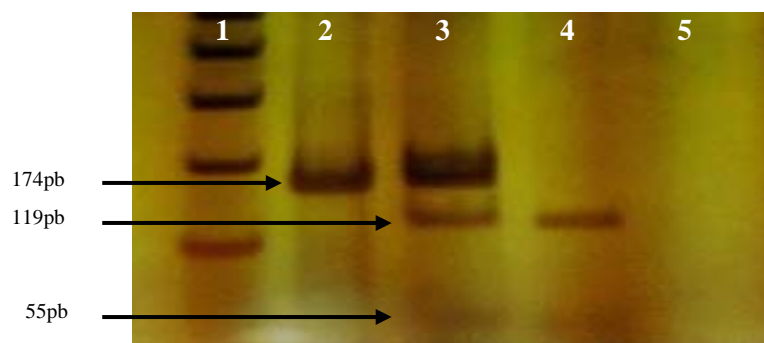


3.7 ANÁLISE DO POLIMORFISMO RS1800566 DO GENE NQO1

A troca de base (C para T) no nucleotídeo 609 na sequência de DNA do gene *NQO1* origina um sítio de restrição para a enzima *Hinf* I. Desta forma, a genotipagem foi realizada por *PCR* e subsequente análise do fragmento de restrição (RFLP). A *PCR* foi realizada em volume final de 12,5 μ l contendo 100 ng de DNA, 1,25 μ l de *buffer* 10X, 1 unidade de Taq-DNAPolimerase (*Invitrogen*TM, *Carlsbad*, EUA), 100 μ mol de dNTPs e 10 pmol de *primer sense* e *primer antisense*. Como controle negativo, em cada reação de *PCR* foi utilizada água ultra-pura ao invés de DNA. Foram utilizados marcadores de DNA de 100 pares de base em cada eletroforese para a confirmação dos tamanhos dos produtos amplificados.

A qualidade da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,8% (174pb). Em seguida, os produtos foram submetidos à digestão enzimática com 1 unidade da enzima *Hinf* I (*Boehringer, Mannheim, Alemanha*) e visualizados após 2 horas de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (figura 2). O alelo prevalente para o polimorfismo de *NQO1* demonstrou um produto de 174pb resistente a digestão enzimática, enquanto o alelo raro T (polimórfico) revelou um fragmento de 119pb e outro de 55pb.

Figura 2 – Perfil eletroforético e coloração com nitrato de prata para o polimorfismo rs1800566 do gene *NQO1*. 1) Marcador de tamanho de fragmento de 100pb (*Ladder*); 2) genótipo homocigoto prevalente CC; 3) genótipo heterocigoto CT; 4) genótipo homocigoto mutante TT; 5) branco da reação.



3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise do estudo de associação foi realizada através do cálculo da *Odds Ratio* (OR), com Intervalo de Confiança a 95% (IC=95%), através do programa estatístico *Graph Pad Prism* versão 6.00 for Windows (*Graph Pad Software, La Jolla California* EUA, www.graphpad.com), como estimativa do Risco Relativo.

Para o gene *NQO1*, no qual os três genótipos foram identificados, ou seja, homocigoto selvagem (CC), heterocigoto mutado (CT) e homocigoto mutado (TT), a significância estatística das frequências genotípicas entre pacientes e controles foi estimada a partir de uma tabela de contingência 3X2. Para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, nos quais os heterocigotos não são identificados pela metodologia utilizada, a significância estatística das frequências genotípicas entre pacientes e controles foi estimada a partir de uma tabela de contingência 2X2. A análise conjunta de genótipos considerados de risco foi realizada através de tabelas de contingência 2X2 considerando-se combinações genotípicas. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para o cálculo do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para o gene *NQO1*.

O princípio de *Hardy-Weinberg* (H-W) foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas do polimorfismo rs1800566 da nossa população estavam em equilíbrio genético. É um modelo matemático utilizado para calcular as frequências alélicas. Demonstra que se não existir fatores evolutivos (mutações, seleção natural, fluxo gênico de populações migrantes e deriva genética) atuando sobre uma população, as frequências gênicas permanecem inalteradas e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo. Para que o princípio seja demonstrado, a população em questão deve estar em equilíbrio genético.

Os testes do Qui-Quadrado de *Pearson*, exato de *Fisher* e correlação de *Spearman* foram utilizados na comparação entre os parâmetros histopatológicos, clínicos, de prognóstico e terapêutica em relação aos diferentes genótipos, através do programa estatístico *SPSS* (versão 20). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico, que será submetido à publicação em um periódico indexado no *Medline*: “Clinical and Experimental Medicine” (fator de impacto 2.3) – *Qualis* B1 na Medicina I.

Artigo Científico

Título: “Polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *NQO1* não estão associados à suscetibilidade, prognóstico e sobrevida nas pacientes portadoras de câncer de mama”

Artigo a ser submetido à revista “Clinical and Experimental Medicine”

Fator de impacto: 2.3

***Qualis* B1 (Medicina I)**

RESUMO

Câncer de mama, doença incomum antes dos 35 anos, mas de incidência crescente após esta idade, é a principal neoplasia entre as mulheres no mundo. O equilíbrio metabólico entre as taxas de absorção e eliminação de xenobióticos tem um papel importante na prevenção de danos no DNA e, conseqüentemente, no desenvolvimento tumoral. Polimorfismos em enzimas fundamentais na homeostasia celular, como as glutationa-S-transferases (GSTs) e as NAD(P)H oxiredutases, e seu papel na suscetibilidade a diversas neoplasias tem sido extensivamente investigado. Dentre os genes mais estudados encontram-se *GSTM1* e *GSTT1*, os quais são polimórficos por deleção e o gene *NQO1*, que possui um polimorfismo de base única (rs1800655), que diminui a atividade enzimática. Dentro deste contexto, objetivou-se analisar polimorfismos nestes genes em 121 pacientes com diagnóstico confirmado e 151 controles livres de neoplasia mamária, na busca por marcadores relacionados ao câncer de mama. O estudo de associação caso-controle não indicou associações positivas ou negativas entre a presença das variantes polimórficas e a suscetibilidade a esta neoplasia. Também não foram observadas diferenças nas distribuições genotípicas em relação aos parâmetros clínicos, de prognóstico e resposta terapêutica das pacientes. Deste modo, na amostra deste trabalho, os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *NQO1* não se mostraram candidatos a marcadores moleculares no contexto amplo da carcinogênese mamária.

Palavras chave: câncer de mama, polimorfismos genéticos, *GSTM1*, *GSTT1*, *NQO1*, suscetibilidade, prognóstico, sobrevida.

INTRODUÇÃO

Câncer de mama, doença incomum antes dos 35 anos, mas de incidência crescente após esta idade, é a principal neoplasia entre as mulheres no mundo, tendo sido previsto pela *International Agency For Research on Cancer* (IARC), para o ano de 2012, a incidência de 1.676.633 casos, levando a morte 521.817 mulheres. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima para 2014 57.120 novos casos e o óbito de 13.225 mulheres (1). Isto tem levado a comunidade científica a desenvolver inúmeros estudos na busca por uma maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesta neoplasia.

O manejo atual do câncer de mama consiste no controle da doença local com cirurgia e radioterapia e tratamento da doença sistêmica com quimioterapia, hormonioterapia e terapia molecular. Alguns critérios prognósticos e preditivos são fundamentais na definição terapêutica, como estadiamento, tamanho do tumor, grau tumoral, comprometimento linfonodal, receptores hormonais e expressão do HER2.

Segundo Shastry (2), variações inter-individuais na resposta ao tratamento de pacientes com câncer constituem num sério problema e não existem até o momento biomarcadores que possam predizer qual grupo responderá positivamente e quais indivíduos não irão responder ou sofrerão os efeitos adversos da presença das drogas no organismo, o que torna o estudo de genes metabolizadores de grande valia para a oncologia. Dentre as variantes genéticas do metabolismo de xenobióticos que têm sido associadas de forma mais consistente com o aumento do risco de câncer incluem-se a família das Glutathiona S-transferases (GSTs) e das NAD(P)H oxiredutases (*NQO1*).

Os genes da família das GSTs mais estudados são *GSTM1* e *GSTT1*. O gene *GSTM1*, localizado no cromossomo 1, é polimórfico possuindo 3 variáveis, sendo dois alelos funcionais (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) e um alelo com atividade nula por deleção (*GSTM1*0*), cuja frequência na população humana encontra-se entre 40 a 60% (3). O gene *GSTT1*, localizado no cromossomo 22, também é polimórfico, podendo apresentar genótipo nulo por deleção, cuja frequência encontrada na população varia de 11 a 38% (Arruda et al., 1998). Estudos detectaram uma frequência elevada do genótipo nulo para estes dois genes em indivíduos portadores de diferentes neoplasias, principalmente os cânceres de pulmão, bexiga e cavidade bucal (4). Olshan e colaboradores (5) demonstraram um aumento no risco de

desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos portadores de deleções do gene *GSTT1*. Torresan e colaboradores (6) analisaram mutações polimórficas em genes envolvidos com metabolização de estrogênio e xenobióticos em uma amostra de mulheres brasileiras e observaram associações positivas com o câncer de mama, especialmente quando combinações de genótipos de risco foram analisadas.

Envolvida no metabolismo das quinonas, a enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (*NQO1*) é uma redutase que participa na proteção contra efeitos tóxicos de algumas drogas anti-cancerígenas classificadas como quinonas como por exemplo a mitomicina e doxorubicina (7), está envolvida na defesa contra formas reativas de oxigênio e estabilização do gene supressor de tumor *p53* (8). O gene que codifica para esta enzima (*NQO1*) possui um polimorfismo de base única (C609T) que causa uma mudança na sequência de aminoácidos (Pro187Ser) (9-11). Esta mutação ocasiona a perda de sua função, na qual indivíduos heterozigotos (CT) apresentam baixa atividade da enzima, enquanto homozigotos recessivos (TT) não demonstram seus efeitos citoprotetores e encontram-se na população humana numa frequência que varia de 4 a 20% (12), o que tem sido associado ao risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer (13-15). Foi verificado por Jamieson e colaboradores (16), em um estudo envolvendo resposta a terapia adjuvante no câncer de mama, que o genótipo TT estava associado com pior evolução clínica e baixa probabilidade de sucesso terapêutico.

Dentro deste contexto, levando-se em consideração os resultados contraditórios da literatura em relação a polimorfismos em genes envolvidos em processos de metabolização e a necessidade de se buscar marcadores associados à recidiva e sobrevida de pacientes com câncer, este estudo objetivou analisar mutações polimórficas nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *NQO1*, na busca por marcadores relacionados à suscetibilidade, prognóstico e sobrevida para o câncer de mama.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Na primeira etapa do presente estudo foi realizado um estudo de associação caso-controle para comparar a presença dos polimorfismos propostos entre os dois grupos, na busca por marcadores associados a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama. Paralelamente foi realizado um estudo transversal para avaliar a associação da presença dos polimorfismos com os fatores prognósticos das pacientes. Num segundo momento, as pacientes foram avaliadas num estudo de Coorte, por um período de pelo menos 18 meses de seguimento, para a avaliação dos parâmetros de recidiva e sobrevida.

Caracterização da amostra

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231/Plataforma Brasil No. CAAE 171231134,0000.5231). No Hospital do Câncer de Londrina e em uma Unidade Básica de Saúde de Londrina (UBS Orlando Sestari, Bairro União da Vitória) foram realizadas as entrevistas com cada sujeito da pesquisa, pacientes e controles, respectivamente, que receberam as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido, para posterior coleta do material e dados clínico patológicos

O presente trabalho foi constituído por uma amostra consecutiva e de conveniência. Foram coletados 5ml de sangue periférico (anticoagulante Heparina) e dados relevantes de 121 pacientes com média de idade de 51,59 (\pm 11,27) anos, com diagnóstico clínico e histopatológico confirmado de câncer de mama. Como grupo controle foram coletadas 151 amostras de sangue periférico de mulheres maiores do que 18 anos, com média de idade de 43,68 (\pm 14,38) anos sem história pessoal e familiar de neoplasia maligna e sem evidência de câncer de mama ao exame físico e com mamografia atualizada para o momento da coleta. As pacientes continuaram em acompanhamento ambulatorial e os dados de sobrevida e recidiva foram coletados após um período de pelo menos 18 meses de acompanhamento. O

período de coleta das pacientes foi de julho de 2010 a setembro de 2011. Todos os sujeitos da pesquisa foram obtidos da mesma região (Londrina/PR).

Análise histopatológica

A análise histopatológica, bem como a análise imunohistoquímica foram realizadas no Laboratório de Patologia do Hospital do Câncer de Londrina, através de coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) ou com anticorpos monoclonais específicos, em cortes histológicos de amostras incluídas em blocos de parafina, para confirmação do diagnóstico de câncer de mama e subclassificação tumoral. A classificação histopatológica dos tumores foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (WHO). O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o sistema TNM (tumor/nódulo/metástase) do câncer (17, 18).

Extrações de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 µl de sangue periférico total pelo Kit de Extração *Mini Spin Plus* (BioPur, Curitiba, Paraná, BR) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho *NanoDrop 2000c® Spectrophotometer* (*ThermoScientific, Wilmington, Delaware, EUA*) nos comprimentos de onda 260/280 nm.

Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Análise da presença/ausência em homozigose dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

A reação de co-amplificação em cadeia pela polimerase foi realizada baseada no protocolo de PCR Multiplex de ABDEL-RAHMAN et al. (1996), modificado, nas seguintes condições: tampão da enzima (20 mM de tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂; 10 pmol de cada iniciador; 1,25 U de Taq DNA polimerase; 2 mM de dNTPs; 100 ng de DNA genômico e água ultra-pura estéril para completar o volume

final de 25 µl. Os fragmentos foram amplificados em termociclador PTC-100 (*MJ Research, Inc*) e submetidos à eletroforese (3V/ml) em gel de poliacrilamida 10% e visualizados através da técnica de coloração por nitrato de prata. Usado como controle interno da reação, os iniciadores para o gene *CYP1A1* amplificaram um fragmento não polimórfico de 312 pb. Os fragmentos de 215 e 480 pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos (Tabela 1). A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene, ou para ambos.

Análise do polimorfismo rs1800566 do gene *NQO1*

A genotipagem foi realizada por PCR e subsequente análise do fragmento de restrição (RFLP) (Tabela 1). A PCR foi realizado em volume final de 12,5 ul contendo 100 ng de DNA como padrão, 1,25 µl de *buffer* 10X, 1 unidade de Taq-DNApolimerase (*InvitrogenTM, Carlsbad, EUA*), 100 µmol de dNTPs e 10 pmol de cada iniciador. A amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,8% (174pb). Em seguida, os produtos foram submetidos à digestão enzimática com 1 unidade da enzima *Hinf* I (*Boehringer, Mannheim, Alemanha*) e visualizados após 2 horas de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. O alelo prevalente demonstrou um produto de 174pb resistente à digestão enzimática, enquanto o alelo raro T (polimórfico) foi reconhecido pela enzima de digestão, produzindo então dois fragmentos, um de 119pb e outro de 55pb.

Tabela 1 - Iniciadores e condições de amplificação para os genes candidatos de suscetibilidade (*NQO1*, *GSTM1* e *GSTT1*).

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Ciclagem da reação
<i>NQO1</i> (C>T)	5'AAGCCCAGACCAACTTCT3' 5'ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG 3'	94°C - 5min; 40 ciclos(94°C-1 min, 56°C- 1 min, 72°C-2 min) 72°C-10 min
	<i>GSTM1:</i> 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' e 5'GTTGGGCTAAATATACGGTGG3'	
<i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> (deleção gênica)	<i>CYP1A1:</i> 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'	94°C-5 min; 30 ciclos (94°C-1 min, 59°C- 1 min, 72°C-1 min) 72°C-5 min
	<i>GSTT1:</i> 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3' 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'	
Enzima de restrição <i>Hinf</i> I	Seqüência de clivagem 5'G↓ANTC 3'	Condições da clivagem 37°C por 3 horas

Análise estatística dos dados

Para a análise do estudo de associação foram utilizadas tabelas de contingência 2X2 para as GSTs e 3x2 para a *NQO1* e calculada a *Odds Ratio* (OR), com Intervalo de Confiança a 95% (IC=95%), através do programa estatístico *GraphPadPrism* versão 6.00 for Windows (*GraphPad Software, La Jolla California* EUA, www.graphpad.com), como estimativa do Risco Relativo. O princípio de *Hardy-Weinberg* (H-W) foi utilizado para verificar se as frequências genótípicas do polimorfismo rs1800566 (onde foram identificados os heterozigotos) estavam em equilíbrio genético nesta população.

Os testes do Qui-Quadrado de *Pearson*, exato de *Fisher* e correlação de *Spearman* foram utilizados na comparação entre os parâmetros histopatológicos, clínicos, de prognóstico e sobrevida em relação aos diferentes genótipos, através do programa estatístico *SPSS* (versão 20). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

Das pacientes analisadas, 17,4% apresentaram-se ao diagnóstico em estágio I, 45,2% em estágio II, 30,4% em estágio III e 7,0% em estágio IV. Foi verificado que 40,7% das pacientes se mostraram portadoras de tumor de alto grau nuclear (grau 3) e 61,4% tiveram metástase para linfonodos axilares. A superexpressão do oncogene HER2 foi detectada em 21,9% das pacientes. Quanto aos receptores hormonais, 76,9% apresentaram receptor de estrógeno e ou progesterona positivo e, 13,9% das pacientes apresentaram tumor subtipo triplo negativo. Para a grande maioria das pacientes, o tratamento inicial teve a finalidade curativa. O controle da doença local foi realizado com cirurgia e radioterapia adjuvante e o tratamento da doença sistêmica com quimioterapia, hormonioterapia e trastuzumabe. Foram identificados registros de 110 (90,90%) pacientes submetidas à cirurgia (cirurgia radical ou conservadora), e destas, 62 (56,36%) receberam radioterapia, 99 (90%) foram submetidas à quimioterapia, 74 (67,27%) a hormonioterapia e 13 (11,81%) pacientes foram tratadas com Trastuzumabe adjuvante. A maioria (90%) das pacientes analisadas permaneciam vivas e livres de doença durante o período de seguimento realizado (Tabela 4).

Estudo de associação caso-controle

Para o polimorfismo do gene *GSTT1*, 15,70% das pacientes apresentaram o genótipo homozigoto para a deleção e 84,30% apresentaram o gene presente, pelo menos em heterozigose. Já no grupo controle, 21,85% apresentaram a deleção em homozigose, enquanto 78,15% apresentaram o gene presente, pelo menos em heterozigose (Tabela 2). Em relação ao gene *GSTM1*, 54,54% das pacientes apresentaram genótipo homozigoto para a deleção, enquanto 45,46% tiveram o gene presente, pelo menos em heterozigose. No grupo controle, 49% apresentaram perfil genotípico homozigoto para a deleção e 51% tiveram o gene presente pelo menos em heterozigose (Tabela 2).

Das 121 amostras diagnosticadas com neoplasia mamária, 9,91% apresentaram genótipo homozigoto para a deleção dos dois genes

simultaneamente (*GSTT1* e *GSTM1*). Já no grupo controle, a dupla deleção foi observada em 13,24% dos indivíduos (Tabela 2).

Para o polimorfismo do gene *NQO1*, observamos que 6,61% das pacientes (n=8) e 10,59% das controles (n=16) foram homozigotas para o alelo mutado (T/T) (Tabela 3). Em relação aos demais genótipos, 46,28% (n=56) e 46,35% (n=70) foram homozigotas prevalentes (C/C), enquanto 47,10% (n=57) e 43,04% (n=65) foram heterozigotas (C/T), dentre pacientes e controles, respectivamente. A frequência alélica foi 0,7 e 0,66 para o alelo prevalente C e 0,3 e 0,34 para o alelo mutado T, dentre pacientes e controles, respectivamente (Tabela 3).

O estudo de associação caso-controle não indicou associações positivas ou negativas entre a presença das variantes polimórficas de forma isolada e a suscetibilidade ao câncer de mama, tanto em relação aos genótipos quanto aos portadores dos alelos considerados de risco, como demonstrado nas Tabelas 2 e 3. Quando os alelos ou genótipos considerados de risco foram avaliados de forma combinada, também não foram observadas diferenças significativas (*GSTM1/GSTT1* dupla deleção + *NQO1* (presença do alelo T pelo menos em heterozigose)): $OR=1,71$; $IC95\%=0,58-5,07$.

Comparação entre a presença das mutações polimórficas e os dados clínicos, prognósticos e de sobrevida das pacientes

Não foi possível obter os dados clínicos e/ou histopatológicos de todas as pacientes, devido à ausência dos respectivos dados em alguns prontuários. As Tabelas 4 e 5 apresentam a caracterização completa da amostra em relação aos parâmetros clínicos, histopatológicos, de prognóstico e sobrevida que foram analisados, bem como a análise destes em relação aos diferentes genótipos dos marcadores propostos.

Não foram observadas significâncias estatísticas para os parâmetros prognósticos grau nuclear, tamanho de tumor, presença de metástase em linfonodo e/ou à distância ao diagnóstico e estadiamento clínico. Também não foram observadas significâncias estatísticas quando avaliados os subtipos definidos pela imunohistoquímica (receptores hormonais positivos, superexpressão do oncogene

HER2 e triplo-negativas). Foram ainda avaliados os parâmetros sobrevida livre de doença e recidiva, após um período de seguimento de pelo menos 18 meses, mas os resultados obtidos também não indicaram significância estatística em relação aos marcadores genéticos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 2. Distribuição genotípica e estudo de associação dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* entre pacientes com câncer de mama e controles livres de neoplasia.

		<i>GSTT1</i> Presente	<i>GSTT1</i> Deletado	<i>GSTM1</i> Presente	<i>GSTM1</i> Deletado	Genótipo duplo Deletado
Caso	121	102 (84,3%)	19 (15,7%)	55 (45,46%)	66 (54,54%)	12 (9,91%)
Controle	151	118 (78,15%)	33 (21,85%)	77 (51%)	74 (49%)	20 (13,24%)
OR		0,67		1,25		0,72
IC (95%)		0,36 – 1,24		0,77 – 2,02		0,34 – 1,54

OR=odds ratio; IC= intervalo de confiança.

Tabela 3. Distribuição genotípica e estudo de associação para o polimorfismo *NQO1* (rs1800655) em pacientes com câncer de mama e controles livres de neoplasia.

	Cas o	(%), n= 121	Control e	(%), n=151	OR	IC (95%)
Frequência Alélica						
C	169	(69,83%)	205	(67,88%)	0,9	(0,63-1,3)
T	73	(30,17%)	97	(32,12%)	1	
Genótipos						
CC	56	(46,28%)	70	(46,36%)	-	-
CT	57	(47,11%)	65	(43,05%)	1,1	(0,67-1,81)
TT	8	(6,61%)	16	(10,6%)	0,6	
					2	(0,25-1,57)
CC	56	(46,28%)	70	(46,36%)	1,0	(0,62-1,62)
CT+TT	65	(53,72%)	81	(53,64%)	0	
CC+CT	113	(93,39%)	135	(89,4%)	0,5	(0,24-1,45)
TT	8	(6,61%)	16	(10,6%)	9	

OR=odds ratio; IC= intervalo de confiança. Para este marcador, onde foram determinados os heterozigotos, o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi calculado e os resultados indicaram que ambos os grupos estavam dentro do equilíbrio ($p > 0,05$).

Tabela 4. Caracterização da amostra e análise da associação entre os polimorfismos dos genes *NQO1*, *GSTT1* e *GSTM1*, de forma isolada e combinada, com os parâmetros prognósticos e de resposta terapêutica das pacientes com câncer de mama.

Parâmetros	n	%	<i>NQO1</i> (rs1800600)		<i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> <i>nulo</i>		Portador do Alelo T e <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> <i>nulo</i>		
			χ^2	r_s	χ^2	r_s	χ^2	r_s	
Estadiamento do tumor (n=115)									
Estágio I	20	17,4							
Estágio II	52	45,2							
Estágio III	35	30,4	0,834	0,889	0,676	0,942	0,423	0,653	
Estágio IV	8	7,0							
Grau Nuclear (n=108)									
Grau 1	17	15,7							
Grau 2	47	43,5	0,992	0,965	0,810	0,606	0,44	0,348	
Grau 3	44	40,7							
Tamanho de Tumor (n=112)									
até 1,5cm	25	22,3							
de 1,5 a 3,0cm	49	43,8	0,786	0,617	0,940	0,766	0,746	0,954	
acima de 3,0cm	38	33,9							
Mestástase em Linfonodo (n=114)									
Ausência	44	38,6	0,947 ^a	0,948	0,817 ^b	0,819	0,116 ^c	0,118	
Presença	70	61,4							
Sobrevida (n=98)									
Livre de doença	89	90,8	0,412 ^d	0,427	0,991 ^e	0,991	0,628 ^f	0,632	
Com doença	9	9,2							

Recidiva (n=107)

Ausência	90	84,1	0,785 ^g	0,788	0,149 ^h	0,152	0,273 ⁱ	0,278
Presença	17	15,8						

χ^2 =teste de qui-quadrado; r_s =coeficiente de correlação de Spearman; ^a Teste exato de Fisher $F=0,630$; ^b $F=0,525$; ^c $F=0,149$; ^d $F=0,552$; ^e $F=0,734$; ^f $F=0,502$; ^g $F=0,627$; ^h $F=0,163$; ⁱ $F=0,345$.

Tabela 5. Caracterização da amostra e análise da associação entre os polimorfismos dos genes *NQO1*, *GSTT1* e *GSTM1*, de forma isolada e combinada, com os subtipos do câncer de mama caracterizados segundo o perfil de imunohistoquímica.

Subtipos	N	%	NQO1 (rs1800600)		GSTT1/GSTM1 nullos		Portador do Alelo T + GSTT1/ GSTM1 nullos		
			χ^2	r_s	χ^2	r_s	χ^2	r_s	
Receptor Hormonal (n=117)									
Negativo	27	23,1	0,722 ^a	0,725	0,247 ^b	0,251	0,462 ^c	0,466	
Positivo	90	76,9							
Superexpressão do HER2 (n=105)									
Não	82	78,1	0,614 ^d	0,618	0,413 ^e	0,418	0,749 ^f	0,752	
Sim	23	21,9							
Triplo Negativo (n=115)									
Não	99	86,1	0,248 ^g	0,251	0,627 ^h	0,631	0,905 ⁱ	0,906	
Sim	16	13,9							

χ^2 =teste de qui-quadrado; r_s =coeficiente de correlação de *Spearman*; ^aTeste exato de *Fisher* $F=0,661$; ^b $F= 0,453$;
^c $F=0,680$; ^d $F= 1,00$; ^e $F=0,680$; ^f $F=1,00$; ^g $F= 0,251$; ^h $F=1,00$; ⁱ $F=1,00$.

DISCUSSÃO

O câncer de mama é a principal causa de mortes entre as mulheres. Em seus estágios iniciais, geralmente não é fatal, no entanto, o desenvolvimento de metástases é responsável por pelo menos 90% da mortalidade associada a esta doença. A taxa de sobrevivência cai de 90% para o tumor localizado para 20% nas pacientes metastáticas (19). Ainda, segundo Stopeck e colaboradores (20), o desenvolvimento concomitante de biomarcadores e terapias direcionadas é o novo paradigma para alcançar melhores resultados e poupar as pacientes com tumores malignos de mama da toxicidade das drogas terapêuticas. De acordo com os mesmos autores, somente através do desenvolvimento de um tratamento baseado em biomarcadores, o verdadeiro potencial das terapias-alvo será alcançado, o que ressalta a importância de se buscar marcadores moleculares que possam estar envolvidos no metabolismo das próprias drogas alvo, bem como de agentes quimioterápicos, com implicações no prognóstico, sobrevida e resposta terapêutica.

Este estudo objetivou a análise de variantes genéticas envolvidas com o metabolismo de compostos exógenos e endógenos em amostras de pacientes e controles oriundas da região Sul do Brasil, na busca por marcadores associados à patogênese do câncer de mama. Para o polimorfismo do gene *GSTT1*, 15,70% das pacientes e 21,85% das controles apresentaram o genótipo homozigoto para a deleção polimórfica. Já em relação ao gene *GSTM1*, 54,54% das pacientes e 49% das controles apresentaram o genótipo homozigoto para a deleção (Tabela 2). Nossos dados corroboram estudos prévios descritos na literatura em relação à frequência destas mutações, uma vez que segundo Arruda e colaboradores (21), a deleção em homozigose de *GSTM1* é observada variando de 20 a 70% nas diferentes populações, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38%.

O estudo de associação caso-controle não indicou associações positivas ou negativas entre a presença das variantes polimórficas das glutatonas e a suscetibilidade ao câncer de mama nesta amostra brasileira (Tabela 2). Entretanto, os resultados da literatura são bastante contraditórios quando mutações polimórficas em genes que atuam no metabolismo de xenobióticos são associadas à suscetibilidade ao desenvolvimento tumoral, incluindo o câncer de mama. Como

exemplo, estudos detectaram uma frequência elevada do genótipo nulo para estes dois genes em indivíduos portadores de cânceres de pulmão, bexiga, cavidade bucal (4). Losi-Guembarovski e colaboradores (22) não observaram associações positivas ou negativas para *GSTM1* e *GSTT1* em relação à suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço, já o grupo de Olshan (5) demonstrou um aumento no risco de desenvolvimento desta mesma neoplasia em indivíduos portadores de deleções em *GSTT1*. Para o câncer de mama, Torresan e colaboradores (6) analisaram mutações polimórficas em diferentes genes envolvidos com metabolização de estrogênio e de xenobióticos, incluindo *GSTM1* e *GSTT1*, também em uma amostra de mulheres brasileiras. Os autores observaram que um gene da família das glutations, o *GSTP1* (glutathione P1) foi positivamente associado à doença, mas que, principalmente, combinações de genótipos de risco se mostraram positivamente associadas ao desenvolvimento maligno, o que ressalta a importância de se analisar combinações genotípicas para genes de baixa penetrância em diferentes modelos tumorais.

Para o polimorfismo do gene *NQO1*, observamos que 6,61% das pacientes e 10,59% das controles foram homozigotas para o alelo mutado (TT) (Tabela 3). Vários estudos epidemiológicos e moleculares foram realizados nos últimos anos para avaliar a associação entre este mesmo polimorfismo Pro187Ser de *NQO1* e a suscetibilidade ao câncer de mama. No entanto, os resultados permanecem conflitantes. Uma meta-análise envolvendo 3177 casos de câncer de mama e 4.038 controles, com base em 7 trabalhos, apontou que a variante genética não foi positivamente associada a um aumento significativo do risco de desenvolver câncer da mama (14). Nossos dados corroboram os descritos nesta meta-análise, uma vez que nosso estudo de associação também não indicou associações significantes para este polimorfismo. Entretanto, na análise estratificada por etnia, os mesmos autores observaram uma associação positiva em mulheres Caucásicas, o que não pode ser diretamente comparado aos resultados obtidos neste estudo, uma vez que, apesar da nossa amostra ser predominantemente Caucásica, dada a colonização Européia da região Sul do Brasil, a população brasileira é extremamente heterogênea (21) e resultados de populações com alto grau de miscigenação devem ser avaliados com cautela e não podem ser comparados a resultados obtidos em populações homogêneas como a Européia, por exemplo.

Outra meta-análise (23) envolvendo 92 estudos, com 21.178 casos e 25.157 controles, observou risco aumentado para câncer de um modo geral na população mundial em portadores do alelo variante T de *NQO1*, entretanto, quando foi analisado especificamente o câncer de mama, não foram observados resultados significantes, o que reforça o fato de variantes genéticas distintas poderem conferir risco maior ou menor dependendo do tumor que está sendo abordado.

Assim, uma vez que a carcinogênese é influenciada por vários genes, uma única variante polimórfica possui, individualmente, um efeito pequeno, mas o risco populacional atribuído aos genes de suscetibilidade pode ser significativo, justificando a realização da análise de variantes simultaneamente num mesmo estudo (24). Também, segundo (25), o impacto de um único polimorfismo genético pode ser pequeno ou inexistente, mas a análise de interações entre várias variantes pode evidenciar uma suscetibilidade maior ou menor ao desenvolvimento tumoral. Como exemplo destas interações foi sugerido uma maior suscetibilidade para indivíduos que possuem uma combinação de genótipos considerados de risco, como presença do alelo *CYP1A1*2A* (Citocromo P4501A1) e *GSTM1/GSTT1* nulos (26-28). Dentro deste contexto, partindo do fato de que deficiências em mais de uma enzima atuante na homeostasia celular poderiam ter um impacto maior na suscetibilidade ao câncer de mama, neste trabalho, as variantes genéticas também foram analisadas de forma agrupada, levando-se em conta a presença de mais de uma mutação em um mesmo indivíduo. Entretanto, no presente trabalho, também não foram observados resultados significantes em relação às combinações dos genótipos considerados de risco.

De um modo geral, a ausência de associações obtidas neste estudo de caso-controle pode ser explicada pelo fato das enzimas analisadas pertencerem a famílias compostas por genes que realizam as mesmas funções, ou funções semelhantes, de modo que possa coexistir uma compensação enzimática. Adicionalmente, sabe-se que o câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea, composta por diferentes subtipos tumorais, os quais apresentam marcadores moleculares bem definidos, e a amostra deste estudo levou em consideração o câncer de mama como um todo, de forma que um possível resultado mais específico pode não ter sido evidenciado.

Parâmetros clínico-patológicos foram validados e servem como um guia para o uso da terapia sistêmica e o estabelecimento do prognóstico. Estes incluem tamanho do tumor, comprometimento de linfonodo, grau histológico, idade, perfil molecular e resposta à terapia, dentre outros (29). Neste estudo, em relação à análise de parâmetros prognósticos, também não foram observadas significâncias estatísticas em relação a grau nuclear, tamanho de tumor, presença de metástase em linfonodo e/ou à distância e estadiamento clínico. Adicionalmente, foram ainda avaliados os parâmetros ligados a resposta terapêutica: sobrevida livre de doença e recidiva, após um período de acompanhamento de pelo menos 18 meses. Entretanto, os resultados obtidos também não indicaram significância estatística em relação aos marcadores genéticos (Tabela 4). Os polimorfismos genéticos também foram avaliados em relação aos subtipos moleculares estabelecidos segundo o perfil de imunohistoquímica, e os resultados também indicaram ausência de associação (Tabela 5).

Podemos sugerir que os resultados negativos obtidos no presente estudo relativos à sobrevida e recidiva podem ser devidos ao curto período de acompanhamento das pacientes, apenas 18 meses, de modo que uma reavaliação destes parâmetros após um período maior de seguimento poderá fornecer dados diferenciados. Torresan e colaboradores (6) também não observaram correlações significantes quando diferentes genótipos em genes de metabolismo foram analisados em relação a parâmetros clínicos e histopatológicos de pacientes com câncer de mama (comprometimento de linfonodos, grau nuclear e tamanho de tumor). Entretanto, outro estudo demonstrou que o SNP rs1800566 foi positivamente associado com uma pior evolução clínica e que pacientes ER/PR negativas portadoras do genótipo selvagem (CC) de *NQO1* apresentaram uma maior sobrevida, ressaltando a importância de se estudar esta variante genética em subtipos de câncer de mama, especialmente os Luminais A e B, positivos para os receptores de estrógeno e/ou progesterona (16).

Na amostra do presente trabalho, os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *NQO1* não se mostraram positivamente associados ao desenvolvimento, prognóstico ou resposta ao tratamento a curto prazo de pacientes com câncer de mama em uma amostra brasileira da região sul. Como já mencionado, nossa amostra levou em consideração o câncer de mama como um todo, sem especificação de subtipo

tumoral, de modo que sugerimos a importância de estudos adicionais envolvendo subgrupos diferentemente tratados na rotina clínica, como os Luminais e HER2+, pelo fato de possuírem drogas alvo que podem ser diferentemente metabolizadas por estes genes. Entretanto, os dados obtidos são relevantes para a comunidade científica, pois indicam que os genes abordados neste estudo não parecem constituir bons marcadores no contexto amplo da carcinogênese mamária, principalmente na população sul brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. Estimate 2014: Cancer Incidence in Brazil. INCA ed. Rio de Janeiro 2013. p. 118.
2. Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *The pharmacogenomics journal*. 2006;6(1):16-21. Epub 2005/11/23.
3. Widersten M, Pearson WR, Engstrom A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi. *The Biochemical journal*. 1991;276 (Pt 2):519-24. Epub 1991/06/01.
4. Au WW, Oh HY, Grady J, Salama SA, Heo MY. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2001;37(3):215-25. Epub 2001/04/24.
5. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2000;9(2):185-91. Epub 2000/03/04.
6. Torresan C, Oliveira MM, Torrezan GT, de Oliveira SF, Abuazar CS, Losi-Guembarovski R, et al. Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. *Clinical and experimental medicine*. 2008;8(2):65-71. Epub 2008/07/12.
7. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-biological interactions*. 2000;129(1-2):77-97.
8. Nioi P, Hayes JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutation research*. 2004;555(1-2):149-71.
9. Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA, et al. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *British journal of cancer*. 1997;75(1):69-75.
10. Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Danenberg PV, Ross D, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res*. 1992;52(4):797-802.
11. Ross D, Traver RD, Siegel D, Kuehl BL, Misra V, Rauth AM. A polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1): relationship of a homozygous mutation at position 609 of the NQO1 cDNA to NQO1 activity. *British journal of cancer*. 1996;74(6):995-6.
12. Lanciotti M, Dufour C, Corral L, Di Michele P, Pigullo S, De Rossi G, et al. Genetic polymorphism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase is associated with an increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia without MLL gene rearrangements. *Leukemia*. 2005;19(2):214-6.
13. Zhang J, Schulz WA, Li Y, Wang R, Zotz R, Wen D, et al. Association of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism with esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *Carcinogenesis*. 2003;24(5):905-9.
14. Yuan W, Xu L, Chen W, Wang L, Fu Z, Pang D, et al. Evidence on the association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer risk in

- the current studies: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2011;125(2):467-72.
15. Malik MA, Zargar SA, Mittal B. Role of NQO1 609C>T and NQO2-3423G>A polymorphisms in susceptibility to gastric cancer in Kashmir valley. *DNA and cell biology*. 2011;30(5):297-303.
 16. Jamieson D, Cresti N, Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Hawsawi NM, et al. Two minor NQO1 and NQO2 alleles predict poor response of breast cancer patients to adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide therapy. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(12):808-19.
 17. Beahrs O, Rubin P, Carr D. Toward a unified TNM staging system. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1977;2(11-12):1185-9.
 18. INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde. 2007.
 19. Mukherjee D, Zhao J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *American journal of cancer research*. 2013;3(1):46-57. Epub 2013/01/30.
 20. Stopeck AT, Brown-Glaberman U, Wong HY, Park BH, Barnato SE, Gradishar WJ, et al. The role of targeted therapy and biomarkers in breast cancer treatment. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(7):807-19. Epub 2012/06/14.
 21. Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clinical genetics*. 1998;54(3):210-4.
 22. Losi-Guembarovski R, Colus IM, De Menezes RP, Polisel F, Chaves VN, Kuasne H, et al. Lack of association among polymorphic xenobiotic-metabolizing enzyme genotypes and the occurrence and progression of oral carcinoma in a Brazilian population. *Anticancer Res*. 2008;28(2A):1023-8. Epub 2008/05/30.
 23. Lajin B, Alachkar A. The NQO1 polymorphism C609T (Pro187Ser) and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *British journal of cancer*. 2013;109(5):1325-37. Epub 2013/07/19.
 24. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutation research*. 2003;544(2-3):339-48. Epub 2003/12/04.
 25. Kadlubar FF. Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants. *Mutation research*. 2001;482(1-2):111-3. Epub 2001/09/06.
 26. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation research*. 2000;464(1):65-76. Epub 2000/01/14.
 27. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2001;154(2):95-105. Epub 2001/07/12.
 28. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral diseases*. 2003;9(2):62-7. Epub 2003/03/27.
 29. Masood S. Prognostic/predictive factors in breast cancer. *Clinics in laboratory medicine*. 2005;25(4):809-25, viii. Epub 2005/11/26.

5 CONCLUSÕES

- O estudo caso-controle não indicou associações significativas entre a presença das variantes polimórficas nos genes *GSTM1*, *GSTT1* ou *NQO1* e a suscetibilidade ao câncer de mama, quando as mutações foram analisadas individualmente ou de forma combinada;
- Não foram observadas associações significativas quando os genótipos considerados de risco foram avaliados em relação aos parâmetros prognósticos de forma individual ou combinada;
- Também não foram observadas associações significativas em relação aos parâmetros sobrevida livre de doença e recidiva, tanto quando os mesmos foram analisados de forma isolada como em combinações genotípicas consideradas de risco.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Apesar de algumas análises serem realizadas em subgrupos moleculares e histopatológicos, nosso estudo levou em consideração o câncer de mama como um todo, a partir de uma amostra de 121 pacientes, de modo que sugerimos a importância de estudos adicionais, com maior poder estatístico para subgrupos tratados diferentemente na rotina clínica, como os Luminais (A e B) e HER2+, pelo fato de possuírem drogas alvo que podem ser especificamente metabolizadas pelos genes considerados neste trabalho.
- Sugerimos também estudos adicionais em pacientes submetidas à quimioterapia com doxorubicina, visto tratar-se de uma quinona, uma vez que existem trabalhos prévios sugerindo associação prognóstica em relação a NQO1.
- De um modo geral, os dados obtidos neste estudo são relevantes para a comunidade científica, pois indicam que os genes abordados podem não constituir bons marcadores no contexto amplo da carcinogênese mamária.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman, S. Z., R. A. el-Zein, et al. (1996). "A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies." Cancer Lett **107**(2): 229-233.
- Anwar, A., D. Dehn, et al. (2003). "Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems." J Biol Chem **278**(12): 10368-10373.
- Arriagada, R., M. G. Le, et al. (1996). "Conservative treatment versus mastectomy in early breast cancer: patterns of failure with 15 years of follow-up data. Institut Gustave-Roussy Breast Cancer Group." J Clin Oncol **14**(5): 1558-1564.
- Arruda, V. R., C. E. Grignolli, et al. (1998). "Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis?" Clin Genet **54**(3): 210-214.
- Asche, C. (2005). "Antitumour quinones." Mini Rev Med Chem **5**(5): 449-467.
- Asher, G., J. Lotem, et al. (2002). "NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3099-3104.
- Asher, G., J. Lotem, et al. (2002). "Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13125-13130.
- Au, W. W., H. Y. Oh, et al. (2001). "Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk." Environ Mol Mutagen **37**(3): 215-225.
- Autrup, H. (2000). "Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response." Mutat Res **464**(1): 65-76.
- Bergh, J., P. E. Jonsson, et al. (2001). "A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer." Acta Oncol **40**(2-3): 253-281.
- Buetler, T. M. and D. L. Eaton (1992). "Glutathione S-transferases: amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship." Environmental Carcinogenesis Ecotoxicology Review **C10**: 181-203.
- Buzdar, A. U., N. K. Ibrahim, et al. (2005). "Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer." J Clin Oncol **23**(16): 3676-3685.
- Cai, Q., X. O. Shu, et al. (2004). "Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study." Breast Cancer Res **6**(6): R647-655.

- Cascorbi, I. (2006). "Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals." Toxicol Lett **162**(1): 16-28.
- Cavenee, W. K. and R. L. White (1995). "The genetic basis of cancer." Sci Am **272**(3): 72-79.
- Chang, F., S. Syrjanen, et al. (1995). "Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology." J Clin Oncol **13**(4): 1009-1022.
- Clarke, M., R. Collins, et al. (2005). "Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." Lancet **366**(9503): 2087-2106.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." Lancet **365**(9472): 1687-1717.
- Fearon, E. R. (1997). "Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer." Science **278**(5340): 1043-1050.
- Fisher, B., S. Anderson, et al. (2002). "Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer." N Engl J Med **347**(16): 1233-1241.
- Fisher, B., J. Bryant, et al. (1998). "Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer." J Clin Oncol **16**(8): 2672-2685.
- Geisler, S. A. and A. F. Olshan (2001). "GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review." Am J Epidemiol **154**(2): 95-105.
- Giuliano, A. E., K. K. Hunt, et al. (2011). "Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial." JAMA **305**(6): 569-575.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, et al. (2011). "Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." Ann Oncol **22**(8): 1736-1747.
- Gronau, S., D. Koenig-Greger, et al. (2003). "GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity." Oral Dis **9**(2): 62-67.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hashibe, M., P. Brennan, et al. (2003). "Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(12): 1509-1517.

- Hatagima, A. (2002). "Polimorfismos genéticos e metabolismo dos desreguladores endócrinos na suscetibilidade ao câncer." Cadernos de Saúde Pública **18**: 357-377.
- Hayes, J. D. and D. J. Pulford (1995). "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance." Crit Rev Biochem Mol Biol **30**(6): 445-600.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.
- Hong, C. C., C. B. Ambrosone, et al. (2007). "Genetic variability in iron-related oxidative stress pathways (Nrf2, NQO1, NOS3, and HO-1), iron intake, and risk of postmenopausal breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(9): 1784-1794.
- Irish, J. C. and A. Bernstein (1993). "Oncogenes in head and neck cancer." Laryngoscope **103**(1 Pt 1): 42-52.
- Iskander, K., A. Gaikwad, et al. (2005). "Lower induction of p53 and decreased apoptosis in NQO1-null mice lead to increased sensitivity to chemical-induced skin carcinogenesis." Cancer Res **65**(6): 2054-2058.
- Jamieson, D., N. Cresti, et al. (2011). "Two minor NQO1 and NQO2 alleles predict poor response of breast cancer patients to adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide therapy." Pharmacogenet Genomics **21**(12): 808-819.
- Kadlubar, F. F. (2001). "Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants." Mutat Res **482**(1-2): 111-113.
- Knauer, M., S. Mook, et al. (2010). "The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer." Breast Cancer Res Treat **120**(3): 655-661.
- Knudson, A. G. (1985). "Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes." Cancer Res **45**: 1437-1443.
- Koch, C. and K. Nasmyth (1994). "Cell cycle regulated transcription in yeast." Curr Opin Cell Biol **6**(3): 451-459.
- Lanciotti, M., C. Dufour, et al. (2005). "Genetic polymorphism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase is associated with an increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia without MLL gene rearrangements." Leukemia **19**(2): 214-216.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, et al. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med **343**(2): 78-85.
- Lin, S. X., J. Chen, et al. (2010). "Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions." Nat Rev Endocrinol **6**(9): 485-493.

- Long, D. J., 2nd, R. L. Waikel, et al. (2000). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis." Cancer Res **60**(21): 5913-5915.
- Malik, M. A., S. A. Zargar, et al. (2011). "Role of NQO1 609C>T and NQO2-3423G>A polymorphisms in susceptibility to gastric cancer in Kashmir valley." DNA Cell Biol **30**(5): 297-303.
- Mansel, R. E., L. Fallowfield, et al. (2006). "Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial." J Natl Cancer Inst **98**(9): 599-609.
- Monks, T. J., R. P. Hanzlik, et al. (1992). "Quinone chemistry and toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **112**(1): 2-16.
- Monks, T. J. and D. C. Jones (2002). "The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers." Curr Drug Metab **3**(4): 425-438.
- Nioi, P. and J. D. Hayes (2004). "Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors." Mutat Res **555**(1-2): 149-171.
- Norppa, H. (2003). "Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer." Mutat Res **544**(2-3): 339-348.
- Olshan, A. F., R. Li, et al. (2003). "Risk of atherosclerosis: interaction of smoking and glutathione S-transferase genes." Epidemiology **14**(3): 321-327.
- Olshan, A. F., M. C. Weissler, et al. (2000). "GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(2): 185-191.
- Paik, S., G. Tang, et al. (2006). "Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer." J Clin Oncol **24**(23): 3726-3734.
- Parmigiani, R. B. and A. A. Camargo (2004). O genoma Humano e o Câncer. Oncologia Molecular. C. G. R. Ferreira, J.C. (org.). São Paulo, Editora Atheneu: 3-11.
- Perera, F. P. (1997). "Environment and cancer: who are susceptible?" Science **278**(5340): 1068-1073.
- Perez, E. A., E. H. Romond, et al. (2011). "Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31." J Clin Oncol **29**(25): 3366-3373.

- Persson, I., I. Johansson, et al. (1995). "Genetic polymorphism of cytochrome p450 2E1: regulation and toxicological significance." Journal of Occupational and Environmental Medicine **7**: 25-36.
- Ross, D., J. K. Kepa, et al. (2000). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms." Chem Biol Interact **129**(1-2): 77-97.
- Ross, D., R. D. Traver, et al. (1996). "A polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1): relationship of a homozygous mutation at position 609 of the NQO1 cDNA to NQO1 activity." Br J Cancer **74**(6): 995-996.
- Scully, C., J. K. Field, et al. (2000). "Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control." Oral Oncol **36**(3): 256-263.
- Shastry, B. S. (2006). "Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine." Pharmacogenomics J **6**(1): 16-21.
- Siegel, D., D. L. Gustafson, et al. (2004). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger." Mol Pharmacol **65**(5): 1238-1247.
- Sobin, L. H. and C. H. Wittekind (2002). *TNM Classification of Malignant Tumours*. ed., New York: John Wiley & Sons, INC.
- Tamimi, R. M., S. E. Hankinson, et al. (2004). "Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(6): 989-996.
- Torresan, C., M. M. Oliveira, et al. (2008). "Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes." Clin Exp Med **8**(2): 65-71.
- Traver, R. D., T. Horikoshi, et al. (1992). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity." Cancer Res **52**(4): 797-802.
- Traver, R. D., D. Siegel, et al. (1997). "Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase)." Br J Cancer **75**(1): 69-75.
- Tseng, L. M., P. H. Yin, et al. (2009). "Association between mitochondrial DNA 4,977 bp deletion and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 C609T polymorphism in human breast tissues." Oncol Rep **21**(5): 1169-1174.
- Veronesi, U., N. Cascinelli, et al. (2002). "Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer." N Engl J Med **347**(16): 1227-1232.

- Veronesi, U., G. Paganelli, et al. (2003). "A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer." N Engl J Med **349**(6): 546-553.
- Weinberg, R. A. (1991). "Tumor suppressor genes." Science **254**(5035): 1138-1146.
- Widersten, M., W. R. Pearson, et al. (1991). "Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi." Biochem J **276** (Pt 2): 519-524.
- Wunsch Filho, V. and M. A. Zago (2005). "Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment." Rev Saude Publica **39**(3): 490-497.
- Yuan, W., L. Xu, et al. (2011). "Evidence on the association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer risk in the current studies: a meta-analysis." Breast Cancer Res Treat **125**(2): 467-472.
- Zhang, J., W. A. Schulz, et al. (2003). "Association of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism with esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population." Carcinogenesis **24**(5): 905-909.

ANEXO

ANEXO A



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	169/2013
CAAE:	17123113 4 0000 5231
Data da Relatoria:	30/09/2013
Pesquisador(a):	Maria Angelica Ehara Watanabe
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 30 de setembro de 2013.



Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

