

**FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

***Genes de Metabolismo de Genotóxicos: papel na  
susceptibilidade e tratamento do Cancro da  
Mama***

**FÁTIMA MARIA RIOS PERALTA CORREIA**

**2010**

**FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

***Genes de Metabolismo de Genotóxicos: papel na  
susceptibilidade e tratamento do Cancro da Mama***

Dissertação destinada a provas de habilitação ao Grau de Mestre em Ginecologia Oncológica, apresentadas à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva e do Professor Doutor Fernando Jesus Regateiro.

## **AGRADECIMENTOS**

---

À Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva, pela sua disponibilidade e permanente dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Jesus Regateiro.

Ao Professor Doutor Vitor Rodrigues.

À Dr<sup>a</sup> Ondina Campos pelo apoio e incentivo.

À Rita Sousa pelo apoio e companheirismo.

Agradecimento especial aos meus filhos Mariana e Ricardo, de quem privei da minha companhia e apoio enquanto preparava a tese.

À minha mãe que sempre me incentivou e apoiou.

À memória do meu pai de quem o destino me privou do seu amor e da sua presença no início da preparação deste trabalho e que, estou certa, gostaria de me ter visto terminar a Tese.

## ÍNDICE

---

1 - Resumo .....	7
2 - Introdução .....	14
2.1. Epidemiologia molecular do cancro .....	14
2.2. Estudo de doenças complexas .....	16
2.3. Cancro da mama .....	21
2.4. Genes de metabolismo de genotóxicos .....	24
2.4.1. Gene <i>GSTM1</i> .....	29
2.4.2. Gene <i>GSTT1</i> .....	29
2.4.3. Gene <i>GSTP1</i> .....	30
2.5. GSTs e cancro da mama .....	31
2.6. O papel das GSTs na resposta ao tratamento - quimio-resistência e toxicidade medicamentosa .....	33
3 - Objectivos do trabalho .....	36
4 - Material e métodos .....	37
4.1. População estudada .....	37
4.2. Caracterização genotípica .....	38
4.2.1. Extracção do DNA genómico .....	38
4.2.2. Quantificação do DNA .....	39
4.3. Genotipagem dos diferentes genes .....	39
4.3.1. Estudo dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	39

4.3.2. Estudo do gene <i>GSTP1</i> .....	41
<i>GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val</i> .....	41
<i>GSTP1 Ala<sup>114</sup>Val</i> .....	42
4.4. Análise estatística .....	44
5 - Resultados .....	45
5.1. Análise epidemiológica .....	45
5.2. Caracterização dos tumores .....	46
5.3. Frequências alélicas e genotípicas .....	48
5.3.1. Polimorfismos dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	48
5.3.2. Polimorfismo <i>GSTP1Ile<sup>105</sup>Val</i> .....	49
5.3.3. Polimorfismo <i>GSTP1Ala<sup>114</sup>Val</i> .....	50
5.4. Associação entre genótipos dos genes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTP1</i> e o estado hormonal .....	51
5.5. Associações genotípicas .....	53
5.6. Associação entre os polimorfismos genéticos e as características do tumor .....	55
5.7. Influência dos polimorfismos genéticos na toxicidade hematológica .....	60
6 - Discussão .....	62
7 - Perspectivas futuras .....	69
8 - Bibliografia .....	70

9 - Apêndice .....	80
10 - Anexos .....	85

Este trabalho foi financiado pelo CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia).

## 1 - RESUMO

---

O cancro da mama é o tumor mais frequente na mulher em todo o mundo e representa um problema de saúde pública major em muitos países desenvolvidos. A taxa de incidência varia entre 70 a 100 por 100.000 mulheres (*Krajinovic et al, 2001*).

A história familiar de cancro da mama e a história reprodutiva estão associados a uma maior incidência na maioria dos casos. Para os restantes, a etiologia permanece desconhecida. Têm sido desenvolvidos vários estudos epidemiológicos que sugerem um papel do ambiente no desenvolvimento desta doença (*Krajinovic et al, 2001*). Os potenciais carcinogéneos implicados são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e as aminas aromáticas e heterocíclicas presentes na dieta e na exposição profissional e ambiental (*Krajinovic et al, 2001*).

O organismo dispõe de um conjunto de enzimas, nomeadamente da família da glutathione S-transferase, que interferem na biologia do cancro. Estas enzimas catalizam a conjugação da glutathione (GSH) com diversos compostos electrofílicos endógenos e exógenos, estando envolvidas no metabolismo de muitos carcinogéneos e de drogas citotóxicas, como os agentes alquilantes, incluindo as nitrosureias, compostos de platínio e o melfalan. No cancro da mama esporádico, os polimorfismos das glutathione S-transferases, como estão associados a uma maior ou menor actividade enzimática, podem contribuir para a carcinogénese e para diferentes respostas à quimioterapia e ainda podem interferir no prognóstico da doença.

O interesse no estudo destes polimorfismos, mesmo sabendo que conferem um risco moderado, reside no facto de poderem constituir um importante problema de saúde pública, se forem comuns numa determinada população.

O principal objectivo deste estudo tipo caso-controlo, foi avaliar a frequência de alguns polimorfismos da *glutathione S-transferase M1 (GSTM1)*, *glutathione S-transferase T1 (GSTT1)* e da *glutathione S-transferase P1 (GSTP1)* e saber se esses polimorfismos interferiam com a susceptibilidade para o cancro da mama, com a gravidade/agressividade da doença e com a ocorrência de efeitos secundários da quimioterapia.

Caracterizaram-se os seguintes polimorfismos: para o *GSTM1* - deleção homocigótica, *GSTT1* - deleção homocigótica e para *GSTP1* as variantes no éxon 5 (*Ile<sup>105</sup>Val*) e no éxon 6 (*Ala<sup>114</sup>Val*).

Estudaram-se 275 doentes com cancro da mama e um grupo controlo de 276 mulheres sem patologia oncológica, da região Centro de Portugal.

Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram determinados através da técnica de *PCR multiplex*. O estudo do polimorfismo *GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val* foi feito pela técnica *ARMS* e o estudo do polimorfismo *GSTP1 Ala<sup>114</sup>Val* foi feito pela técnica *RFLP*.

A distribuição da frequência genotípica no grupo controlo e no grupo de doentes de *GSTM1\*0/0* e *GSTT1\*0/0* não foi diferente da esperada em relação a outras populações caucasianas: para o *GSTM1\*0/0*, encontrou-se uma frequência de 47,8% e de 53,0%, respectivamente, sendo idêntica à descrita na literatura, que refere que cerca de 20 a 56% dos indivíduos de raça caucasiana têm falta de actividade da *GSTM1* (*Pavanello et al, 2000, Krajinovic et al, 2001; Vogl et al, 2004; Egan et al, 2004*). Neste grupo de mulheres, a frequência genotípica de *GSTT1\*0/0* no grupo controlo e nas doentes foi de 23,1% e 25%, respectivamente. Este valor é idêntico ao referido na literatura - cerca de 14-49% nos indivíduos caucasianos (*Pavanello et al, 2000; Krajinovic et al, 2001; Egan et al, 2004; Steck et al, 2007*).

Neste estudo tipo caso-controlo verificou-se que as frequências genotípicas de *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* na população controlo e no grupo das doentes foi para *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile* de 34,7% e 39,6%, para *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* foi de 45,6 e 49,0% e para *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* foi 17,3% e 10,5%, respectivamente.

Para *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* a frequência genotípica para o grupo controlo e de doentes foi de 73,5% e 83,2% para o genótipo *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala*, de 4,3 e 7,2% para *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Val* e 2,1% e 1,8% para *GSTP1<sup>114</sup>Val/Val*, respectivamente. Estes dados não são diferentes dos encontrados na literatura para a raça caucasiana. De referir que para estes polimorfismos as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O genótipo *GSTM1\*0/0* associou-se a um aumento do risco para cancro da mama de 1,24 vezes (95% IC= 0,88-1,74) e o genótipo *GSTT1 \*0/0* apresentou um aumento de risco para cancro da mama de 1,12 vezes (95% IC= 0,75-1,65). Quando se associaram os genótipos *GSTM1\*0/0* e *GSTT1 \*0/0* houve um aumento de risco para cancro da mama de 1,17 vezes (95% IC = 0,91-1,49).

Os genótipos *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Val* e *GSTP1<sup>114</sup>Val/Val* estão associados a um aumento de risco de 1,22 vezes para cancro da mama, contudo esta diferença também

não tem significado estatístico (OR=1,22; 95% IC= 0,65-2,30). A comparação das distribuições alélicas de *GSTP1 Ala<sup>114</sup>Val* entre as doentes e os controlos não revelou alterações na frequência dos alelos.

Em relação ao polimorfismo de *GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val*, o genótipo *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* apresentou uma menor susceptibilidade para cancro da mama, quando comparado com os genótipos *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile* (OR=0,55; 95% IC=0,33-0,90). Para os genótipos que condicionam uma actividade enzimática normal ou parcialmente alterada (*GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile* e *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val*), verificou-se que o risco para cancro da mama foi 1,8 vezes maior em relação às mulheres com genótipo *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* (OR=1,8; 95% IC= 1,1 - 2,9).

A comparação das distribuições alélicas de *GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val* entre as doentes e os controlos revelou um aumento da frequência do alelo *Ile* na população com cancro da mama (64,6% vs 58,8%) com OR=1,28 (95% IC=1,00-1,63).

Verificou-se que nas mulheres pós-menopáusicas o genótipo *GSTM1\*0/0* esteve associado a um aumento de risco para cancro da mama de 1,34 vezes, aproximando-se da significância estatística (OR=1,34; 95% IC= 0,90-2,00). Esta associação não se verificou nas mulheres pré-menopáusicas (OR = 0,76; 95% IC = 0,38-1,55). Em relação ao genótipo *GSTT1\*0/0*, verificou-se que havia um aumento de risco para cancro da mama de 1,44 vezes nas mulheres pré-menopáusicas e 1,26 vezes na pós-menopausa, embora também sem significado estatístico (OR=1,44; 95% IC=0,59-3,53 e OR=1,26; 95% IC = 0,79-2,02, respectivamente).

Ao fazer uma pesquisa bibliográfica verificou-se que são muito escassos os estudos sobre a associação dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com os factores de prognóstico do cancro da mama e os que se encontram, apenas se referem a alterações do gene *TP53*. Por este motivo, pretendeu-se fazer uma avaliação de uma possível interferência dos polimorfismos na gravidade do cancro da mama, nomeadamente em relação ao estadiamento e às características biológicas consideradas como factores de prognóstico para a doença, como a invasão ganglionar, o grau de diferenciação do tumor, receptores hormonais, sobreexpressão do HERBB2, Ki67, TP53 e invasão linfo-vascular.

Ao comparar os estadios menos graves 0/I e II com os estadios III/IV para os diferentes genótipos, verificou-se que não havia diferença estatisticamente significativa, embora se tenha registado uma tendência para a associação de *GSTM1\*0/0* com os estadios mais avançados (OR=1,23; 95% IC=0,62-2,42).

Em relação à invasão ganglionar axilar, o genótipo *GSTM1\*0/0* foi o que apresentou maior tendência para estar associado a gânglios axilares positivos e o que se aproximou mais da significância estatística (OR=1,49; 95% IC=0,89-2,50). A associação com outros polimorfismos não teve significado estatístico: *GSTT1\*0/0* (OR=1,07; 95% IC=0,59-1,94), *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* (OR=1,33; 95% IC=0,78-2,26) ou *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* (OR=0,82; 95% IC=0,34-1,95).

O genótipo *GSTM1\*0/0* foi o que apresentou maior interferência com os parâmetros avaliados: maior tendência para se associar a receptores de progesterona negativos (OR=1,24; 95% IC=0,72-2,13); aumento de 3 vezes do risco dos tumores serem TP53 positivos (OR=3,00; 95% IC=1,24-7,25) e um aumento de risco de 3,17 vezes dos tumores serem Ki67 positivos (OR=3,17; 95% IC=1,06-9,52). Este genótipo associou-se à presença de tumores ERBB2 positivos, embora sem significado estatístico (OR=1,48; 95% IC=0,78-2,81).

Em relação ao polimorfismo *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val*, na presença de heterozigotia ou homozigotia para o alelo *Val*, verificou-se um aumento de 1,54 vezes de probabilidade de sobreexpressão de ERBB2 (OR=1,54; 95% IC=0,80-2,97) e um aumento de 1,53 vezes de invasão linfo-vascular (OR=1,53; 95% IC=0,80-2,92).

Em relação à influência dos polimorfismos genéticos na toxicidade hematológica, nas doentes com cancro da mama que fizeram quimioterapia, verificou-se que as mulheres com o alelo *Val* em heterozigotia ou homozigotia para o polimorfismo *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val*, apresentaram um risco de 2,97 vezes de maior toxicidade (OR=2,97; 95% IC= 1,03-8,58).

Assim, como conclusão, em relação à susceptibilidade para o cancro da mama, os genótipos *GSTM1\*0/0* e *GSTT1\*0/0* mostraram uma tendência para aumento de risco (OR=1,24; 95% IC = 0,88-1,74 e OR=1,12; 95% IC = 0,75-1,65, respectivamente). Foram considerados marcadores de mau prognóstico o genótipo *GSTM1\*0/0* (associação com tumores TP53 positivos, Ki67 positivos, receptores de progesterona negativos, gânglios positivos e sobreexpressão de ERBB2). Em relação à toxicidade hematológica, o marcador mais importante foi a presença do alelo *Val* em homozigotia ou heterozigotia no polimorfismo *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val*.

A investigação do papel dos polimorfismos dos genes de metabolismo de genotóxicos poderá, no futuro, complementar outros estudos de epidemiologia molecular e contribuir para a identificação de alguns factores de risco e melhor compreensão sobre o processo de carcinogénese do cancro da mama.

## ABSTRACT

---

Breast cancer is the most frequent malignancy among women, representing a major health problem in many developed countries, with an incidence rate varying between 70 and 100 per 100.000 women.

Family history of breast cancer and reproductive history account for majority of cases. In the remainder, the etiology of the disease is unclear. Epidemiological studies have suggested that the environment may play a significant role in the development of breast cancer. The potent carcinogens implicated in breast carcinogenesis are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), aromatic and heterocyclic amines present in the diet and occupational or other environmental exposures.

Many of these polymorphisms change individual variability of enzyme activity and can influence human exposition to carcinogenes.

Inherited differences in the capacity of xenobiotic metabolizing enzymes might be an important factor of genetic susceptibility to cancer.

The analysis of genetic polymorphisms that modulate the reply the environment exposition can be useful to predict individual risks. As many of these genetic variants are relatively common, they can have marked impact in cancer incidence in a particular population.

This case-control study investigated the association between genetic differences in specific genes of glutathione S-Transferase (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) and susceptibility to breast cancer and their influence in prognostic and hematologic toxicity in patients submitted to chemotherapy.

Genotypes of blood specimen DNA were determined for 275 women with breast cancer and 276 control subjects. Associations between specific genotypes and the development of breast cancer were examined by use of logistic regression to calculate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs).

The presence or absence of deletion of genes *GSTM1* and *GSTT1* was determined by simultaneous amplification through the *PCR technique multiplex*. The study of *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* was made by *ARMS* and the study of *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* was made by *RFLP*.

The frequency of genotypes *GSTM1\*0/0* and *GSTT1\*0/0* was not different from other caucasian populations.

In this study, the frequency for genotype *GSTM1*\*0/0 in control and patients group was 47.8% and 53%, respectively, very similar with other caucasians populations that vary from 20% to 56%. For *GSTT1*\*0/0 the frequency in the same groups was 23.1% and 25%, respectively. This data are according with literature that refer 14-49% in caucasian populations. In this study for polymorphism *GSTP1*Ile<sup>105</sup>Val case-control frequencies of genotype were 34.7% and 39.6% for *GSTP1*<sup>105</sup>Ile/Ile, 45.6% e 49% for *GSTP1*<sup>105</sup>Ile/Val and 17.3% and 10.5% for *GSTP1*<sup>105</sup>Val/Val, respectively. For *GSTP1*Ala<sup>114</sup>Val, for cases and controls, the frequency was 73.5% and 83.2% for *GSTP1*<sup>114</sup>Ala/Ala, 4.3% and 7.2% for *GSTP1*<sup>114</sup>Ala/Val and 2.1% and 1.8% for *GSTP1*<sup>114</sup>Val/Val, for control and patients group, respectively. These data were similar to those described in literature for caucasian race.

A borderline significant increase in the risk of breast cancer was seen for *GSTM1*\*0/0 (OR = 1.24; 95% IC=0.88-1.74). For *GSTT1*\*0/0, the data were suggestive of a trend of increasing risk (OR=1.12; 95% IC = 0.75-1.65). If we consider association of these two genotypes, there was 1.17 fold increase in risk (OR=1.17; 95% IC=0.91-1.49).

Genotypes *GSTP1*<sup>114</sup>Ala/Val and *GSTP1*<sup>114</sup>Val/Val were associated to 1.22 fold increase risk for breast cancer, nevertheless this difference was not statistical significant (OR=1.22; 95% IC=0.65-2.30). There was no difference between control group and patients in variant allelic distribution.

For *GSTP1*Ile<sup>105</sup>Val, genotype *GSTP1*<sup>105</sup>Val/Val had lesser risk than *GSTP1*<sup>105</sup>Ile/Val or *GSTP1*<sup>105</sup>Ile/Ile (OR=0.55; 95% IC=0.33-0.90).

In the group of postmenopausal women, *GSTM1*\*0/0 was associated with an increased risk for breast cancer (OR=1.34; 95% IC=0.90-2.00).

In literature there are few studies about polymorphisms and prognostic factors of breast cancer or treatment and toxicity of chemotherapy.

Authors investigated about the relation between polymorphisms and prognostic factors such as stage, axillary lymph nodes metastasis, grade of tumor, hormonal receptors, overexpression of ERBB2, Ki67, TP53 and linfo-vascular invasion.

Our results suggest that there are no differences in polymorphisms in patients with breast cancer classified as 0/I or II Stage comparing with III/IV Stage.

Genotype *GSTM1*\*0/0 was associated with a risk for axillary lymph nodes metastasis (OR=1.49; 95% IC=0.89-2.50).

Genotype *GSTM1\*0/0* was more associated with negative progesterone receptors (OR=1,24; 95% IC=0,72-2,13); with TP53 positive tumors (OR=3,00; 95% IC=1,24-7,25) and with Ki67 positive tumors (OR=3,17; 95% IC=1,06-9,52). This genotype was more associated with overexpression ERBB2 tumors (OR=1,48; 95% IC=0,78-2,81).

Genotype *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val*, with allele *Val*, was associated to 1.54 fold increase risk for overexpression ERBB2 tumors (OR=1,54; 95% IC=0,80-2,97) and 1,53 fold increase of linfo-vascular invasion (OR=1,53; 95% IC=0,80-2,92).

We hypothesized that polymorphisms encoding reduced or absent activity in the GSTs might result in greater risk for chemotherapy-associated toxicity. The present study supports this suggestion, as polymorphism *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* with allele *Val* had 2.97 fold increase risk for hematologic toxicity (OR=2.97; 95% IC=1.03-8.58).

*Conclusions:* these data indicate that genotypes *GSTM1\*0/0* and *GSTT1\*0/0* are associated with an increase risk for breast cancer. The genotype *GSTM1\*0/0* was more associated with tumors TP53 positive, Ki67 positive, negative progesterone receptors and ERBB2- positive disease.

The most important marker for hematologic toxicity was variant allele *Val* of *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* in homozigotia or heterozigotia.

Further research is need to confirm if polymorphisms of genes of metabolism of xenobiotics can contribute for the identification of some risk factors and better understanding the carcinogenesis process of breast cancer. Studies examining the effects of polymorphisms in toxicity, recurrence and survival will allow individualize therapeutics based on genotypes.

## 2 - INTRODUÇÃO

---

### 2.1. **Epidemiologia molecular do cancro**

Em condições normais, o processo de divisão celular é ordenado, permitindo assim, a formação, crescimento, morte e regeneração de tecidos.

No cancro, as células perdem a capacidade de limitar o seu próprio crescimento, passando a multiplicar-se de uma forma rápida e descontrolada. É uma doença que envolve diversas alterações estruturais e dinâmicas no genoma, desconhecendo-se o número de alterações necessárias para o desenvolvimento de uma neoplasia, variando com o tipo de tecido e de tumor.

O processo carcinogénico desenvolve-se em várias etapas, como consequência de múltiplos acontecimentos mutagénicos que se acumulam numa célula e lhe conferem vantagem em termos de sobrevivência, sendo a iniciação, a promoção e a progressão de um tumor resultantes de uma complexa interacção entre factores individuais e ambientais. Uma determinada mutação pode conferir susceptibilidade, que apenas se exprime face à exposição a factores desencadeantes ambientais (v.g., fumo do tabaco), como ocorre com determinados fenótipos metabólicos ou com defeitos de reparação do DNA. Na presença de agressão, pode ocorrer uma nova mutação que confira vantagem proliferativa à célula com autonomização subsequente e expansão clonal (*Regateiro et al, 2002*).

Permanece por esclarecer como é que a exposição a determinados factores ambientais, de uma forma voluntária ou passiva e a factores endógenos, como as espécies reactivas de oxigénio (ROS), pode modificar o risco de aparecimento de certas neoplasias, e quais os mecanismos que determinam a variabilidade da resposta individual a certos estímulos ambientais.

A neoplasia pode ocorrer por acumulação de mutações em genes determinantes, nomeadamente em protooncogenes, antioncogenes ou genes de supressão tumoral, genes de reparação do DNA, genes de metabolismo de genotóxicos e genes de apoptose (Tabela I).

**Tabela I - Principais genes envolvidos no processo da carcinogénese**

Genes	Função dos genes
Protooncogenes	São genes celulares normais, que codificam proteínas constituintes de uma rede implicada na recepção e transdução de sinais e na regulação de expressão génica. Participam na regulação da proliferação celular.
Antioncogenes ou genes de supressão tumoral	São genes que participam na regulação da proliferação e da diferenciação celular, contrabalançando o estímulo proliferativo dos protooncogenes, através de uma acção inibidora.
Genes de reparação do DNA	São genes que permitem a estabilidade do DNA que é assegurada por processos complexos de reparação destinados a evitar a acumulação de lesões no DNA que seriam reproduzidas durante a replicação, originando um clone portador de mutação eventualmente tumorigénica.
Genes de metabolismo de genotóxicos	Grupo de genes envolvidos numa rede complexa de vias metabólicas de biotransformação de xenobióticos, alguns deles genotóxicos e potenciais carcinogéneos.
Genes da apoptose	Grupo de genes envolvidos na apoptose, processo pelo qual as células morrem de forma programada, activado por alterações a nível de estímulos específicos.

*Baseado em Regateiro et al (2002)*

Salienta-se o papel dos *protooncogenes*, que são genes celulares normais, que codificam proteínas que interferem nas vias de estimulação da proliferação celular e os *genes de supressão tumoral ou antioncogenes*, que são genes que participam na regulação da proliferação e da diferenciação celular, contrabalançando o estímulo proliferativo dos protooncogenes, através de uma acção inibidora (Regateiro et al, 2002).

A persistência de mutações carcinogénicas adquiridas vai depender de vários factores de regulação, nomeadamente da eficiência dos mecanismos de reparação do DNA, das defesas antioxidantes, das defesas imunitárias e da capacidade de metabolizar e eliminar os agentes potencialmente tóxicos. Neste processo assume grande interesse o papel dos *genes de metabolismo de genotóxicos* que estão envolvidos em vias metabólicas de biotransformação de xenobióticos.

Existe um número restrito de neoplasias familiares com um padrão de hereditariedade mendeliano, devido à transmissão de mutações germinais específicas num gene, sendo responsável por cerca de 5% a 10% dos tumores. Estes cancros hereditários têm um elevado risco de transmissão e estão relacionados com mutações de

elevada penetrância em genes como: *BRCA<sub>1</sub>*, *BRCA<sub>2</sub>*, *PTEN*, *TP<sub>53</sub>*, *CDH1* e *STK<sub>11</sub>* (Regateiro et al, 2002; Tan et al, 2008).

Os restantes 90 a 95% dos casos de cancro têm uma causa multifactorial, ou seja, decorrem de alterações em múltiplos genes polimórficos com alelos específicos e que se associam a um aumento de risco em relação à doença e à influência de factores ambientais. Podem estar envolvidas mutações patogénicas de moderada penetrância em genes como *ATM*, *CHEK<sub>2</sub>*, *BRIP<sub>1</sub>* e *PALB<sub>2</sub>* ou variantes genéticas de baixa penetrância que são comuns na população em geral e a cada uma pode estar associado um pequeno aumento de risco individual. O risco final para cancro pode depender da contribuição de um número indeterminado de genes de baixa penetrância, que exercem o seu efeito cumulativamente (Houlston et al, 2000; Knudsen et al, 2001).

Mesmo que o efeito de alguns genes seja modesto no risco para cancro, pode ser um problema de saúde pública se forem comuns, podendo haver interesse biológico e médico na identificação dos indivíduos com alto risco. A identificação de perfis de risco constituídos por associação de múltiplos polimorfismos, poderá permitir estabelecer medidas de prevenção e de rastreio e, no futuro, definir protocolos de vigilância de acordo com o risco, seleccionar terapêuticas mais adequadas e implementar o exercício de uma medicina cada vez mais personalizada (Hashibe et al, 2003).

## **2.2. Estudo de doenças complexas**

Os polimorfismos genéticos são variantes genéticas que só por si não se associam a doença (são uma variante do normal) e geralmente ocorrem numa determinada população com uma frequência superior a 1% (Burmeister et al, 1999). No entanto, em certas condições ambientais ou fisiológicas, determinadas associações de polimorfismos podem criar perfis de susceptibilidade à doença.

Os polimorfismos do DNA podem ser classificados em *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, *Variable Tandem Repeats (VNTR)*, *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* e *Copy Number Variation (CNV)*.

O primeiro marcador a ser usado no estudo genético foi o *Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)*, que se baseia no facto de alguns polimorfismos interferirem com locais de restrição enzimática, que podem assim deixar de ser

reconhecidos por uma determinada enzima de restrição, ou pelo contrário, criarem um novo local de restrição enzimática.

Novos avanços surgiram com a utilização dos *VNTR* que englobam minissatélites e microssatélites. Estes são muito polimórficos e consistem numa repetição em *tandem* de uma sequência de tamanho variável.

Os *single nucleotide polymorphisms (SNPs)* são actualmente os marcadores genéticos de eleição e consistem na alteração de um único nucleótido por substituição por outro nucleótido. Muito abundantes no genoma humano, os SNPs representam cerca de 90% de todos os polimorfismos, estimando-se que existam cerca de 11 milhões de *SNPs* com frequência alélica igual ou superior a 1% (*Kruglyak et al, 2001*).

Mais recentemente foram descritos os *Copy Number Variation (CNVs)*, que consistem em variações genómicas estruturais quantitativas (delecção, duplicação, multiplicação) compostas por segmentos longos de DNA que variam de 1 Kilobase (Kb) até vários megabases (mb), podendo englobar um ou vários genes, com possíveis implicações funcionais. Os *CNVs* podem ter um importante potencial no estudo de doenças complexas e ser os marcadores genéticos do futuro (*Nakamura et al, 2009*).

A etiologia das patologias complexas como o cancro é multigénica, em que cada gene implicado pode dar a sua contribuição genética para um determinado fenótipo.

Um número significativo de genes descritos como responsáveis por doenças Mendelianas foram descobertos em grande parte devido aos estudos de *linkage* ou *estudos de ligação*. Esta análise genética baseia-se no facto de, durante a meiose, dois alelos próximos localizados no mesmo cromossoma serem preferencialmente segregados juntos, mais vezes do que seria de esperar pelo simples acaso. Os estudos de *linkage* são geralmente usados em estudos de doenças monogénicas em que estão envolvidos genes de elevada penetrância, em famílias em que a maioria dos indivíduos afectados é portador da mutação. Estes estudos têm pouco poder estatístico para a avaliação de marcadores de baixa ou moderada penetrância, como acontece com os polimorfismos, estando nestes casos mais indicado fazer estudos de associação do tipo caso-controlo. Assim, os *estudos de associação* constituem uma estratégia alternativa mais eficiente na localização de genes de susceptibilidade envolvidos na etiologia de doenças complexas, multifactoriais, pois têm um maior poder estatístico para detectar genes de baixa penetrância (*Risch et al, 1996*). Os estudos de associação são usados em amostras de população no estudo de doenças complexas, podendo ser do tipo *gene-candidato* ou do tipo *genome-wide association studies*. Na metodologia do gene

candidato, selecciona-se um gene para estudo, por se saber que está relacionado com a etiopatogenia de uma determinada doença, ou por estar localizado num *locus* previamente relacionado com a patologia através de estudos de ligação (*Pharoah et al, 2002, Easton et al, 2007*). Seguidamente escolhem-se os SNPs a estudar, podendo ser seleccionados consoante o seu potencial impacto fenotípico na proteína, isto é, se alteram quantitativa ou qualitativamente a proteína.

Os SNPs podem ser *funcionais* ou *não funcionais*. Os SNPs *funcionais* alteram qualitativa ou quantitativamente a função de uma determinada proteína: se localizado em *regiões codificantes* e se forem não sinónimos (alterando o aminoácido e consequentemente a estrutura e a função da proteína) ou se localizados em regiões reguladoras (alterando a taxa de transcrição do gene).

Os SNPs localizados em *regiões não codificantes* podem interferir com a expressão da proteína se localizados em regiões de *splicing* ou se afectarem a estabilidade do mRNA).

Os SNPs *não funcionais* não alteram a função da proteína. Incluem SNPs não sinónimos, mas em que a alteração do aminoácido não interfere com a função da proteína. Estes podem associar-se a patologias por servirem de marcadores genéticos da presença de outros polimorfismos próximos funcionais, com as quais estão em desequilíbrio de ligação.

Actualmente, o recurso à técnica de *microarrays*, facilita a caracterização de centenas de milhares de SNPs em estudos designados por *genome-wide association studies*, e que permitem identificar alelos de risco baixo ou moderado, para os quais se desconhecia previamente quer a sua posição quer a sua função (*Easton et al, 2007*).

O Projecto do Genoma Humano (2003) permitiu um arsenal de informação fundamental e surpreendente sobre a sequência e organização do genoma humano. A seguir à descoberta do genoma humano seguiu-se um outro projecto internacional - HapMap (2005) - com o objectivo de catalogar os padrões comuns de diversidade genética em populações geograficamente diferentes de África, Ásia e Europa. Assim, aproximadamente 4 milhões de *SNPs* foram identificados numa primeira fase e estudados quanto à sua frequência e correlação com as populações, com o objectivo de fornecer elementos para estudos genéticos de associação (*International Human Genome Sequencing Consortium, 2004*).

O Projecto HapMap estudou a correlação entre SNPs, já que estes tendem a relacionar-se de um modo previsível uns com os outros, dada a existência de

desiquilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium - LD*). A presença de *LD* entre dois SNPs significa que estes são herdados mais vezes em conjunto do que seria de esperar pelo simples acaso. Este facto permitiu identificar regiões genómicas com combinações de alelos no mesmo cromossoma descendentes de um antecessor comum, designados de haplotipos, sendo delimitados por pontos de elevada recombinação (*recombination hotspots*).

Os haplótipos demonstraram conter a maioria das variações inter-individuais e podem ser identificados por um conjunto limitado de SNPs em *LD* com os SNPs do bloco a que pertencem. Isto é, a genotipagem de um SNP é preditiva dos restantes contidos no haplótipo (*International Human Genome Sequencing Consortium, 2004*).

Estes SNPs são designados de *tagSNPs* e a sua selecção criteriosa juntamente com o desenvolvimento tecnológico, permitiram uma redução significativa nos custos de genotipagem. Consequentemente, estudos genéticos de associação de todo o genoma tornaram-se exequíveis do ponto de vista financeiro e tecnológico, sem ocorrer perda de poder estatístico em relação aos restantes (*International Human Genome Sequencing Consortium, 2004*).

Assim, o HapMap funciona como uma ferramenta para estudos de associação com o objectivo de identificar os factores genéticos que podem influenciar a susceptibilidade para certas patologias.

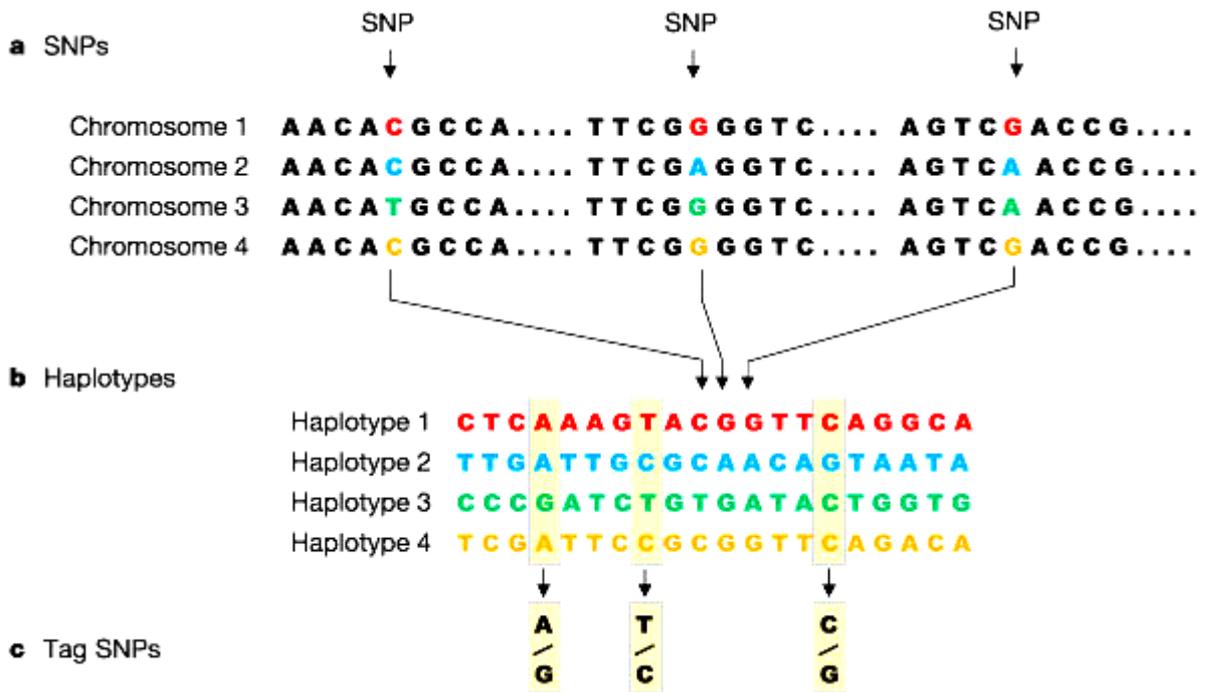


Figura 1 - Esquema representativo da relação entre *SNPs*, haplotipos e *tagSNPs*. Representação de quatro versões de uma região específica de DNA do mesmo cromossoma em diferentes indivíduos. Cada *SNP* tem dois alelos possíveis. Os haplotipos são constituídos por uma combinação de alelos de *SNPs* próximos. A genotipagem dos três *tagSNPs* indicados é por si só suficiente para identificar os quatro haplotipos. Assim, se um determinado cromossoma possuir o padrão *A-T-C* para os três *tagSNPs*, este irá corresponder ao padrão determinado para o haplotipo 1.

Adaptado de *The International HapMap Consortium (2003). Nature 426 : 789-796*

### **2.3. Cancro da mama**

Todos os anos são detectados cerca de 10 milhões de novos casos de cancro da mama no mundo inteiro. Em Portugal esta doença continua a ser a causa de morte por cancro mais comum entre as mulheres, surgindo em cada ano 3 500 novos casos.

A incidência de cancro da mama tem aumentado de forma sistemática na maior parte dos países, sendo considerada uma doença da civilização actual. O pico de maior incidência regista-se entre os 35 e os 50 anos e mais de 20% dos casos ocorre em mulheres com menos de 40 anos.

O cancro da mama associa-se em 10 a 27% dos casos a história familiar, mas só em 5 a 10% das situações surge devido a mutações de elevada penetrância em genes como o *BRCA<sub>1</sub>* e *BRCA<sub>2</sub>* (Dunning *et al*, 1999). Na maioria destes casos o cancro da mama surge em idades mais precoces, geralmente antes dos 50 anos de idade, surge num número elevado de casos numa família, há proximidade do parentesco entre os indivíduos atingidos, há maior probabilidade de bilateralidade, multicentralidade sincrónica ou metacrónica do tumor, podendo ainda surgir diversos tipos de tumores primários (pertencentes ao espectro) num mesmo indivíduo ou nos membros de uma família e há um maior risco de ocorrência em indivíduos de sexo em que o tumor é raro (Regateiro *et al*, 2002).

O cancro da mama não monogénico é uma doença complexa, multifactorial, com forte relação entre factores genéticos e ambientais, sendo mais frequente nas mulheres que vivem em países mais industrializados, o que sugere que factores ambientais e/ou estilo de vida poderão ter uma influência na incidência desta patologia.

Conhecem-se vários factores de risco para cancro da mama e que se relacionam com factores reprodutivos que influenciam os níveis hormonais e exposição a carcinogénicos ambientais. Habitualmente, consideram-se como factores de risco que promovem um aumento da susceptibilidade para este tipo de cancro: a idade, antecedentes de certo tipo de patologia benigna da mama, nuliparidade, não amamentação, idade tardia do primeiro parto, idade precoce da menarca, idade tardia da menopausa ou exposição a hormonas exógenas. A obesidade e a falta de exercício físico, também são factores de risco para cancro da mama na pós-menopausa, provavelmente por influenciarem os níveis hormonais, nomeadamente de estrogénios (Vogl *et al*, 2004).

No entanto, um grande número de casos de cancro da mama não são explicados por estes factores de risco. Há forte suspeição de que a exposição a alguns carcinogéneos pode levar ao aparecimento do cancro da mama. Actualmente, nenhum agente específico foi identificado como estando envolvido directamente nesta doença, excepto as radiações ionizantes (*Fontana et al, 1998*).

Há vários estudos experimentais que salientam o papel dos PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) como carcinogéneos e que podem ser importantes em determinados grupos geneticamente predispostos (*Vogl et al, 2004; McCarty et al, 2009*). Estas substâncias são pró-carcinogéneas, que após activação originam metabolitos reactivos que reagem com o DNA e assim induzem tumorigénese. Os PAH's induzem tumores mamários nos roedores e sabe-se que as células da mama são capazes de metabolizar e activar estas substâncias. Para além disso, encontraram-se aductos de PAHs no DNA de células cancerosas da mama, mas não no DNA de mulheres saudáveis (*Amorim et al, 2002*).

Os componentes celulares do tecido mamário tornam-no um local ideal para armazenamento de conhecidas genotoxinas mamárias, verificando-se que o elevado teor de tecido adiposo na mama permite armazenar e concentrar substâncias lipofílicas, como por exemplo os PAHs (*Saxena et al, 2009*).

Uma das principais fontes de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são o fumo do cigarro, a dieta (carne grelhada, fumados, cereais) e a exposição cumulativa a produtos de combustão do petróleo (*McCarty et al, 2009*).

Nos últimos anos, tem vindo a dar-se importância ao estudo de variantes de baixa penetrância, em genes envolvidos na reparação do DNA, na manutenção da integridade genómica e no controlo da proliferação e diferenciação celular e, especialmente, genes envolvidos no metabolismo de carcinogéneos. As enzimas metabólicas de xenobióticos desempenham um papel fundamental na activação ou destoxificação de toxinas exógenas, prevenindo que reajam com o DNA celular (*Amorim et al, 2002*). As diferenças genéticas nestas enzimas foram associadas à susceptibilidade para desenvolver cancro da mama.

Na Tabela II estão referidos alguns genes com polimorfismos envolvidos na susceptibilidade para o cancro da mama.

**Tabela II - Genes com polimorfismos de baixa penetrância envolvidos na susceptibilidade para cancro da mama**

<b>Tipo de genes</b>	<b>Genes</b>
Oncogenes	<i>HRAS-1</i>
Genes de supressão tumoral	<i>TP53</i>
Genes envolvidos no metabolismo de hormonas esteroides e transdução de sinal	<i>CYP11A1, CYP17, CYP19, COMT, RE, RP</i>
Genes envolvidos no controlo do ciclo celular	<i>PHB, HER2, CCDN1</i>
Genes envolvidos no metabolismo de carcinogénios	<i>SULT1A1, NQO1, GSTs</i>
<b>Genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos</b>	<b><i>GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2</i></b>
Genes de reparação do DNA	<i>XRCC1, XRCC3</i>

Neste trabalho avaliou-se a associação de polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de genotóxicos e de fármacos e o seu papel na susceptibilidade para cancro da mama, assim como a associação com factores de prognóstico associados às características do tumor e ocorrência de efeitos secundários resultantes da administração de citostáticos.

#### **2.4. Genes de metabolismo de genotóxicos**

Os genes de metabolismo de genotóxicos estão associados ao risco para cancro da mama pelo seu envolvimento nos processos metabólicos de xenobióticos. Estes genes frequentemente são polimórficos, conferindo diferenças individuais no que respeita à capacidade ou eficiência metabólica, em face de determinados genotóxicos, consoante o perfil genotípico de um indivíduo. Esta variabilidade genética, a que corresponde uma variabilidade fenotípica, poderá ser responsável por diferentes níveis de protecção para carcinogéneos químicos e, conseqüentemente, diferentes níveis de susceptibilidade para o cancro. O envolvimento destes genes na oncogénese é indirecto e as conseqüências nefastas decorrentes do nível de actividade ou da ausência de actividade reflectem-se, em primeiro lugar, numa agressão generalizada e mais intensa do DNA, por genotóxicos não metabolizados ou genotóxicos resultantes de metabolismo, podendo essa agressão provocar alterações a nível de protooncogenes ou de antioncogenes (*Regateiro et al, 2002*).

Pode haver polimorfismos associados a uma actividade enzimática excessiva ou a uma diminuição da actividade em comparação com a que se verifica para a forma normal do alelo (*Regateiro et al, 2002*).

A presença, num mesmo indivíduo, de dois ou mais génotipos de susceptibilidade pode aumentar o risco relativo para o cancro (*Helzlsouer et al, 1998*).

Quando há variações no processo de activação e destoxificação de substâncias químicas ou drogas há uma variabilidade na resposta de cada indivíduo. A quantidade final de carcinogéneos produzidos depende da acção competitiva de mecanismos que envolvem enzimas da Fase I e da Fase II, que catalizam a activação e destoxificação de xenobióticos, drogas e compostos endógenos.

A *Fase I* é principalmente composta pelas enzimas do citocromo P450 (CYP 450), que actuam numa série de compostos reactivos endógenos e exógenos. Alguns destes metabolitos sofrem posteriormente a acção das enzimas da *Fase II*, como as glutathione S-transferases (GSTs), as sulfotransferases ou as UDP glucuronosiltransferases.

As GSTs são uma família de enzimas que catalizam a conjugação da glutathione (GSH) com vários substratos endógenos e exógenos, protegendo as células da acção dos compostos electrofílicos (Figura 2).

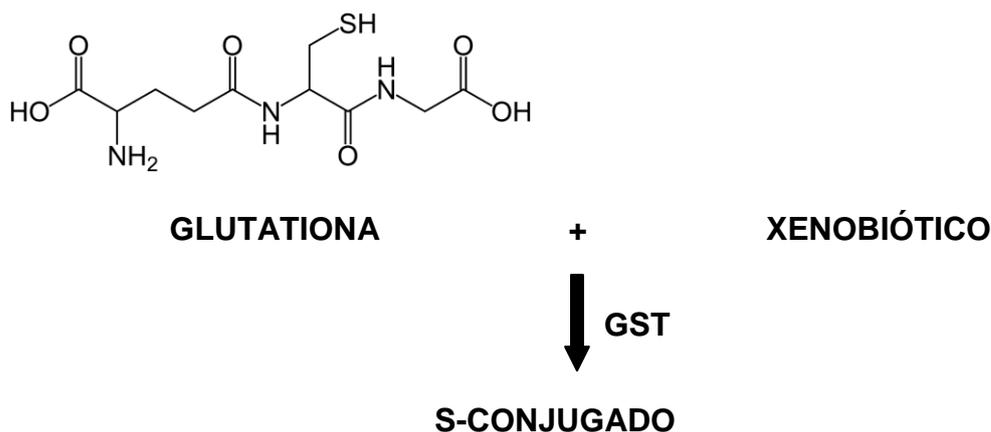


Figura 2 - Conjugação da glutathione (GSH) a um xenobiótico por acção da GST resultando na formação da glutathione-S- conjugado

A glutathione (glutamilcisteinilglicina) é um tripeptídeo linear, constituído por três aminoácidos: glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo tiol deste último, o local activo responsável pelas suas propriedades bioquímicas, funcionando como um anti-oxidante hidrossolúvel. Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG - forma dimerizada da GSH). A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos. Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathione total (menos de 10%). A GSH também pode formar dissulfuretos do tipo GSSR, com o tiol da cisteína presente em proteínas.

A glutathione tem um papel crucial, especialmente na metabolização da água oxigenada e de outros peróxidos de hidrogénio; como co-factor da glutathione-peroxidase; na metabolização de xenobióticos como co-factor da glutathione S-transferase; na desactivação de radicais; no metabolismo do ácido ascórbico; na manutenção da comunicação entre as células; na prevenção da oxidação dos grupos tiol presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular.

Na Tabela III estão representados alguns substratos e as GSTs que são mais importantes no seu metabolismo. Embora apresentem actividade cruzada e complementar, as várias classes de GSTs apresentam maior especificidade para alguns substratos.

**Tabela III - Substratos das GSTs**

	<i>Substratos</i>	<i>GST</i>
<b>Endógenos</b>	O-quinonas das catecolaminas e dopamina	$\mu$ GSTs
	Prostaglandinas	GSTs microsossomais, $\alpha$ GSTs e $\mu$ GSTs
	Produtos lipídicos de peroxidação gerados pelas ROS	$\alpha$ GSTs e $\mu$ GSTs
<b>Exógenos</b>	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)	$\pi$ GSTs
	Aldeídos insaturados $\alpha$ e $\beta$	$\pi$ GSTs
	Moléculas com grupos epóxidos	$\theta$ GSTs
	Agentes quimioterápicos	$\pi$ GSTs, $\alpha$ GSTs

*Townsend et al (2003)*

As enzimas GSTs promovem a conjugação de compostos electrofílicos com a glutationa (GSH), originando compostos inactivados e hidrosolúveis, que podem ser excretados pela urina ou pela bÍlis permitindo, assim, reduzir o risco de cancro. No entanto, quanto mais solúveis são os produtos de alguns compostos, mais carcinogénicos podem ser, nomeadamente em relação a outros menos solúveis. O metabolismo de xenobióticos e de drogas é feito principalmente por um processo de destoxificação, contudo pode haver o risco de se originarem moléculas reactivas electrofílicas, que se podem ligar a macromoléculas (proteínas ou DNA) e desta forma serem potenciais indutores de carcinogénese (*Marie-Genica Consortium on Genetic Susceptibility for Menopausal Hormone Therapy Related Breast Cancer Risk, 2009*).

As GSTs dividem-se em duas super-famÍlias: as enzimas ligadas às membranas microsossomais e as citoplasmáticas. As primeiras têm um papel chave no metabolismo endógeno de leucotrienos e de prostaglandinas. As GSTs citoplasmáticas são as que apresentam mais polimorfismos genéticos na população humana. Estas dividem-se em seis classes, com 30% de homologia das sequências, e são designadas por letras gregas:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\omega$ ,  $\zeta$  (*Danyelle et al, 2003*).

**Tabela III - GSTs citosólicas**

Classe	Gene	Alelos	Cromossoma
Alpha ( $\alpha$ )	<i>GSTA1-2</i>	<i>GSTA</i> *A-B <i>GSTA</i> *A-B	6
Mu ( $\mu$ )	<i>GSTM1-4</i>	<i>GSTM1</i> *A,B,C, <i>nulo</i> <i>GSTM3</i> *A,B,C, <i>nulo</i> <i>GSTM4</i> *A,B,C, <i>nulo</i>	1, 6, 13
Omega ( $\omega$ )	<i>GSTO1</i>		
Pi ( $\pi$ )	<i>GSTP1</i>	<i>GSTP1</i> *A-D	11
Theta ( $\theta$ )	<i>GSTT1-2</i>	<i>GSTT1</i> *A e <i>nulo</i>	22
Zeta ( $\zeta$ )	<i>GSTZ1</i>	<i>GSTZ1</i> *A-D	14

As GSTs estão presentes no fígado dos mamíferos, constituindo 4% do total de proteínas solúveis (Landi *et al*, 2000).

A GSTT (Teta) é considerada a enzima mais antiga do ponto de vista evolutivo e enzimas GSTT – like foram encontradas em mamíferos, peixes, insectos, plantas, algas unicelulares e bactérias. Pensa-se que um gene GSTT ancestral sofreu duplicações gerando a variedade de GSTs (Landi *et al*, 2000). Ambas as enzimas GSTM1 e GSTT1 têm actividade sobre hidroperóxidos lipídicos e claramente uma actividade na remoção destes compostos, que podem ser a chave para as lesões no DNA e sua citotoxicidade.

Estudos recentes demonstraram o papel regulador das classes  $\mu$  e  $\pi$  das GSTs na via da MAP (*mitogen-activated protein*) cinase, que interfere com as vias de sinalização da morte e da sobrevivência celular. Especificamente a GST  $\pi$  é um inibidor da JNK1 (*c-Jun N-terminal Kinase 1*), uma cinase que está envolvida na resposta ao stress, na apoptose e na proliferação celular. Nas células que não estão em stress, observa-se uma baixa actividade da JNK devido ao sequestro da proteína: complexo GST  $\pi$ : JNK. A supressão da actividade da JNK é revertida em condições de stress oxidativo, resultando na dissociação do complexo GST  $\pi$ : JNK, iniciando-se a indução da apoptose. Este

papel não enzimático da GST  $\pi$  vai ter uma relevância directa nos fenótipos com sobreexpressão da GST, condicionando resistência de alguns tumores aos citotóxicos (Hezlsouer et al, 1998). Foram referidas funções semelhantes na regulação de vias de sinalização activadas por stress para outras famílias das GSTs. Adicionalmente a GST $\omega$  interfere na regulação de receptores envolvidos na homeostase de Cálcio (Burg et al, 2006). Todos estes achados revelam que os inibidores das GSTs, para além da sua capacidade de modular a conjugação com a GSH, também podem influenciar os processos de sinalização celular (Burg et al, 2006).

Na tabela V estão representados algumas substâncias para as quais o desenvolvimento de resistência parece associar-se ao aumento de expressão das GSTs.

**Tabela V - Agentes associados com o aumento dos níveis das GSTs e resistência**

<p><i>Substratos das GSTs</i></p> <p>Clorambucil</p> <p>Melfalan</p> <p>Mostarda nitrogenada</p> <p>Mostarda fosforamida</p> <p>Acroleína</p> <p>Carmustine</p> <p>Ácido etacrínico</p> <p>Esteroides</p>
<p><i>Não caracterizados como substratos</i></p> <p>Antimetabolitos*</p> <p>Drogas antimicrotúbulos*</p> <p>Inibidores da Topoisomerase I e II*</p> <p>Bleomicina</p> <p>Hepsulfam</p> <p>Mitomicina C*</p> <p>Doxorrubicina*</p> <p>Cisplatina*</p> <p>Carboplatina</p>

Townsend et al (2003).

\* Requerem a activação JNK para a citotoxicidade máxima

#### **2.4.1. Gene GSTM1**

O primeiro polimorfismo na classe das GSTs foi descoberto na GSTM. A classe  $\mu$  inclui pelo menos 5 genes que codificam um igual número de enzimas (GSTM1, M2, M3, M4 e M5). O gene que codifica a GSTM1 é constituído por 7 exões no cromossoma 1p13.3 e tem como variantes os alelos: *GSTM1\*A*, *GSTM1\*B*, *GSTM1\*C* e nulo (Pavanello et al, 2000; Gemignami et al, 2007).

Parece não haver diferenças aparentes em relação ao tipo de substrato entre *GSTM1\*A* e *\*B* e o alelo *\*C* é muito raro. O alelo nulo apresenta uma deleção total do gene, que em homozigotia determina a ausência completa da expressão da enzima. Cerca de 20 a 56% dos indivíduos de raça caucasiana têm falta de actividade da GSTM1 (Pavanello et al, 2000; Vogl et al, 2004).

A homozigotia para o alelo *GSTM1\*0* foi relacionada com o aumento da susceptibilidade para o cancro do pulmão, cólon e bexiga (Fontana et al, 1998; Helzlsouer et al, 1998).

As isoenzimas GSTM1 estão expressas em muitos tecidos, nomeadamente, fígado, intestino, estômago, cérebro, urotélio, linfócitos (Fontana et al, 1998; Vogl et al, 2004).

#### **2.4.2. Gene GSTT1**

O gene da *GSTT1* foi isolado e sequenciado por Pemble estando localizado em 22q11.2 e possui cinco exões. O gene *GSTT1* é polimórfico nos seres humanos, tendo dois alelos principais: o alelo *GSTT1\*1* e o alelo nulo *GSTT1\*0*.

Cerca de 14-49% dos indivíduos caucasianos e 80% dos asiáticos são homozigotos para o alelo nulo (Pavanello et al, 2000; Krajinovic et al, 2001; Egan et al, 2004; Steck et al, 2007).

O genótipo *GSTT1\*0/0* foi associado a um aumento de risco de colite ulcerosa, cancro colorectal e síndromes mielodisplásicas (Helzlsouer et al, 1998).

É difícil prever as consequências biológicas do genótipo *GSTT1\*0/0*, pois a enzima tem por um lado, propriedades de destoxificação, e por outro lado, de activação de muitos poluentes ambientais. A enzima GSTT1 é primariamente expressa no fígado e nos eritrócitos (Vogl et al, 2004).

### **2.4.3. Gene GSTP1**

A GSTP1 é a principal GST citosólica em órgãos como o baço, coração e pulmão e pode estar expressa quer no tecido normal, quer no tecido tumoral da mama (Vogl *et al*, 2004).

As primeiras referências a polimorfismos no gene *GSTP1* foram feitas em 1989 por Board e colegas (Pavanello *et al*, 2000). O gene *GSTP1* localiza-se em 11q13 e é polimórfico, condicionando importantes diferenças na actividade da enzima de acordo com o genótipo apresentado. Foram identificados dois locais polimórficos: no exão 5 *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* (313 A>G; rs947894) e no exão 6 *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* (341 C>T; rs1799811) (Ziminiak *et al*, 1994, Gemignami *et al*, 2007).

A presença da enzima GSTP1 em muitos tecidos, juntamente com a sua capacidade para inactivar carcinogéneos como epóxidos diol dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sugere que o polimorfismo no gene está envolvido na susceptibilidade para o cancro, nomeadamente cancro da bexiga e testicular (Pavanello *et al*, 2000; Helzlsouer *et al*, 1998).

Ziminiak *et al* referem que o alelo *GSTP1<sup>105</sup>Val* reduz a actividade catalítica quando expresso na *Escherichia coli*, e estudos laboratoriais sugerem que este alelo está associado a uma redução da actividade enzimática da enzima GSTP1 em amostras de tecido pulmonar (Helzlsouer *et al*, 1998). A simples substituição de um nucleótido (A - G), na posição 313 do gene *GSTP1* resulta na substituição da Isoleucina pela Valina. Os aminoácidos Alanina, Valina e Isoleucina pertencem ao mesmo grupo químico (Grupo D) dos aminoácidos e têm uma estrutura semelhante. Contudo, como *Ile<sup>105</sup>*, no exão 5, se situa no local activo da enzima, a substituição por Valina poderá afectar a actividade enzimática.

Em vários trabalhos é referido que 50-66% dos indivíduos são homocigóticos *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile*, 30-43% heterocigóticos para *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e 5-9% homocigóticos para a variante alélica *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* (Dirven *et al*, 1994; Sweeney *et al*, 2000; Krajinovic *et al*, 2001; Egan *et al*, 2004; Steck *et al*, 2007).

A variante *GSTP1<sup>114</sup>Val* é rara, surgindo em menos de 15% da raça caucasiana (Sweeney *et al*, 2000) e na literatura encontram-se muito menos referências em relação ao polimorfismo de *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val*. Emburgh *et al* (2008) apresentam uma frequência genotípica do grupo controlo e do grupo de doentes com cancro da mama de mulheres

de raça caucasiana de 84% e 87,5% para os genótipos *GSTP1*<sup>114</sup>*Ala/Ala*, 12,2 e 14,5% para *GSTP1*<sup>114</sup>*Ala/Val* e 0,2 e 0,5% para *GSTP1*<sup>114</sup>*Val/Val*, respectivamente.

## **2.5. GSTs e cancro da mama**

Estão publicados vários trabalhos sobre a associação entre os polimorfismos dos genes das *GSTs* e a susceptibilidade para cancro da mama. Estes polimorfismos alteram a actividade enzimática, o que condiciona a activação ou inactivação de genotóxicos endógenos (ROS) e exógenos.

Os múltiplos estudos que analisaram os polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e a sua associação com a susceptibilidade para cancro da mama mostraram resultados pouco reprodutíveis e não conclusivos. Este problema surge pela dificuldade em avaliar os efeitos destes genes de baixa penetrância, com os múltiplos factores envolvidos na etiopatogenia do cancro da mama.

A tabela IV apresenta alguns resultados dos estudos publicados. A maioria dos trabalhos atribuem um maior risco para cancro da mama ao genótipo *GSTM1* \*0/0. Em relação aos polimorfismos do gene *GSTT1*, a maioria dos trabalhos ou não encontram associação ou revelam um aumento de risco associado ao genótipo *GSTT1* \*0/0.

Os estudos são mais controversos em relação aos polimorfismos do gene *GSTP1*.

Da pesquisa bibliográfica que foi feita, não encontramos referência a trabalhos que avaliassem a associação dos polimorfismos destes genes com os factores de prognóstico de cancro da mama, pelo que este trabalho é inovador nesta área.

**Tabela IV - Referências bibliográficas relativas a alguns estudos de associação entre susceptibilidade para cancro da mama e os principais polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*.**

Gene	Polimorfismos	Resultados	Referências
<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1*0/0</i>	Aumento de risco com genótipo <i>GSTM1*0/0</i> em doentes com mais de 55 anos. Risco maior em afro-americanas que em mulheres caucasianas.	Fontana et al (1998)
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i> <i>GSTP1</i>	<i>GSTM1*0</i> <i>GSTT1*0</i> <i>GSTP1Ala<sup>114</sup>Val</i>	<i>GSTM1*0/0</i> - aumento de risco (OR=2,10; 95% IC=1,22-3,64) <i>GSTT1*0/0</i> ( OR=1,50; 95% IC=0,76-2,95) <i>GSTP1<sup>114</sup> Val/Val</i> (OR=1,97; 95% IC=0,77-5,02) O risco aumenta com a associação <i>GSTM1*0/0</i> , <i>GSTT1*0/0</i> <i>GSTP1<sup>114</sup> Ala/Val</i> ou <i>Val/Val</i> .	Helzlsouer et al (1998)
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i> <i>GSTP1</i>	<i>GSTM1*0/0</i> <i>GSTT1*0/0</i>	Delecção em <i>GSTM1</i> não alterou o risco para cancro da mama (OR=1,1; 95% IC=0,7-1,6 ) <i>GSTT1*0/0</i> aumento de risco para cancro da mama em 1,7 vezes (OR=1,7; 95% IC=1,0-3,0) Polimorfismo em <i>GSTP1</i> não alterou o risco para cancro da mama (OR=0,9; 95% IC=0,6-1,5)	Krajcinovic et al (2001)
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	<i>GSTT1*0/0</i> <i>GSTM1*0/0</i>	Estudo numa população brasileira. Não houve diferenças estatisticamente significativas: <i>GSTT1*0/0</i> (OR=0,98; 95% IC=0,60-1,60) <i>GSTM1*0/0</i> (OR=0,95; 95% IC=0,62-1,47) <i>GSTM1*0/0</i> + <i>GSTT1*0/0</i> (OR=0,85; 95% IC=0,36-1,91)	Amorim et al (2002)
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i> <i>GSTP1</i>	<i>GSTT1*0/0</i> <i>GSTM1*0/0</i> <i>GSTP1Ile<sup>105</sup>Val</i>	Não houve diferenças estatisticamente significativas: <i>GSTT1*0/0</i> (OR=1,11; 95% IC=0,87-1,41) <i>GSTM1*0/0</i> (OR=0,98; 95% IC=0,86-1,12) <i>GSTP1</i> com mutação heterozigota (OR=1,01; 95% IC=0,79-1,28) e com mutação homozigota (OR=0,93; 95% IC=0,62-1,38)	Vogl et al (2004)
		Estudo numa população asiática. Delecção em <i>GSTM1</i> ou <i>GSTT1</i> não alterou o risco para cancro da mama. <i>GSTT1*0/0</i> (OR=0,97; 95% IC=0,83-1,15) <i>GSTM1*0/0</i> (OR=0,97; 95% IC=0,82-1,14) Verificou-se aumento de risco para cancro da mama com o genótipo <i>GSTP1<sup>105</sup>Val/Val</i> (OR=1,92; 95% IC=1,21-3,04)	Egan et al (2004)
		Estudo numa população indiana. Aumento de risco para cancro da mama: <i>GSTM1*0/0</i> (OR=2,28; 95% IC=1,65-2,97) <i>GSTP1<sup>105</sup>Val/Val</i> (OR=2,59; 95% IC=1,67-4,39) <i>GSTM1*0/0</i> + <i>GSTT1*0/0</i> + <i>GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val</i> e <i>Val/Val</i> (OR=4,02; 95% IC=1,99-8,51)	Saxena et al (2009)

## **2.6. O papel das GSTs na resposta ao tratamento - quimio-resistência e toxicidade medicamentosa**

A resposta a várias drogas e os efeitos secundários variam de doente para doente e é um problema major na prática clínica e no desenvolvimento de novos fármacos. Por este motivo, torna-se importante identificar as causas genéticas que estão subjacentes à ocorrência de toxicidade ou falta de resposta ao tratamento. Numa meta-análise de 39 estudos prospectivos de hospitais dos EUA, 6,7% dos doentes tiveram reacções secundárias graves a drogas e em 0,32% dos casos foram fatais, sendo responsáveis por 100.000 mortes/ano nos EUA. Estes dados colocam os efeitos adversos dos fármacos entre a quarta e a sexta causa de morte hospitalar (*Meyer et al, 2000*).

Há vários factores de risco potenciais para que uma droga seja ineficaz ou cause toxicidade: idade do doente, função renal e hepática, outras doenças associadas, consumo de álcool ou tabaco. Para além destes factores, e provavelmente mais importantes, são os factores hereditários que alteram a cinética ou dinâmica das drogas.

A farmacocinética das drogas, incluindo a sua absorção, ligação a proteínas plasmáticas, distribuição, metabolismo e eliminação, pode ser influenciada por factores genéticos. Os factores genéticos também influenciam a farmacodinâmica, isto é, a resposta dos tecidos ou órgãos. Assim, as variações genéticas nestas áreas podem determinar quer os efeitos secundários, quer a eficácia terapêutica (*Ates et al, 2004*).

A utilização da quimioterapia e/ou radioterapia no cancro da mama reduz significativamente o risco de recorrência e mortalidade (*Ambrosone et al, 2001*). A dificuldade reside muitas vezes, em se avaliar o ganho absoluto *versus* a toxicidade inerente a cada tratamento. Assim, a identificação de marcadores genéticos de resposta à terapêutica, quer em termos de sensibilidade, quer em termos de toxicidade iatrogénica, seriam da máxima utilidade.

O mecanismo de citotoxicidade da quimioterapia faz-se através da formação de ROS (espécies reactivas de oxigénio), que causam lesões nas células, proteínas e DNA ou interagem com outras moléculas, produzindo produtos oxidantes secundários, moléculas reactivas, que contribuem para a citotoxicidade através dos mesmos mecanismos (*Ambrosone et al, 2001*).

Uma área que tem merecido ainda pouca atenção é a do estudo das características endógenas de cada doente para responder a elementos reactivos

oxigenados e seus subprodutos que resultam da terapêutica citotóxica e na toxicidade (Ambrosone et al, 2001).

As GSTs são enzimas que têm como substratos uma grande variedade de fármacos, como por exemplo: acetaminofeno, menadiona, fosfomicina, ácido etacrínico, nitroglicerina, mizantrone e drogas alquilantes como nitrosureia, melfalano, ciclofosfamida, clorambucilo, tiotepa e Cisplatina.

As GSTs (nomeadamente da classe  $\alpha, \mu, \epsilon, \pi$ ) foram implicadas no desenvolvimento de resistência a agentes de quimioterapia (Burg et al, 2006). Verificou-se *in vitro* que, nas células tumorais resistentes aos alquilantes havia sobreexpressão das GSTs e um aumento da conjugação da GSH com estes agentes ou seus metabolitos. Por outro lado, verificou-se um aumento da sensibilidade das células tumorais aos agentes alquilantes, incluindo células resistentes à droga, se houvesse uma depleção celular dos níveis da GSH ou se se inibisse a actividade celular das GSTs. Outros mecanismos que podem contribuir para a resistência dos alquilantes incluem a redução de *uptake* da droga, redução na bioactivação da droga e aumento na reparação de *cross-links* do DNA (Pandya et al, 2000).

Na prática clínica o papel das GSTs na farmacogenética oncológica ainda não está totalmente esclarecida e vários estudos revelam resultados contraditórios. Na tabela VI estão referidos alguns trabalhos que relacionam polimorfismos genéticos com acção de citostáticos e com o prognóstico da doença.

**Tabela VI - Referências bibliográficas relativas a alguns estudos de associação entre os principais polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e resultados com quimioterapia.**

<b>Polimorfismo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referências</b>
<i>GSTP1</i> Ile <sup>105</sup> Val	A variante <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Val teve redução na eficiência do Clorambucil em 7,5 vezes, quando comparada com <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Ile.	Bailey et al (1998)
<i>GSTM1</i>	Doentes com o genótipo <i>GSTM1</i> *0/0 tiveram menor sobrevivência. Não é referido se fizeram tratamento adjuvante e OR não ajustado para factores de prognóstico!	Nedelcheva et al (1998)
<i>GSTP1</i> Ile <sup>105</sup> Val	Mulheres com genótipo <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Val/Val tiveram maior sobrevivência que mulheres homozigotas para o alelo <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Ile. Eficácia catalítica em relação à tiotepa foi 2 vezes inferior nas doentes com o genótipo <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Val/Val, quando comparada com <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Ile/Val.	Sweeney et al (2000)
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	Risco de morte e de recorrência foi inferior em doentes com genótipos <i>GSTM1</i> *0/0 e <i>GSTT1</i> *0/0, quando comparado com doentes com os alelos presentes (HR=0,59; 95% IC=0,36-0,97; HR=0,51; 95% IC=0,29-0,90, respectivamente).	Ambrosone et al (2001)
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	Doentes tratadas com FEC com o genótipo <i>GSTM1</i> *0/0 e <i>GSTT1</i> *0/0 tinham menor risco de recorrência e de morte.	Innocenti et al (2002)
<i>GSTP1</i> Ile <sup>105</sup> Val	Mulheres homozigotas para <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Val tiveram maior sobrevivência em relação às mulheres homozigotas para o alelo <i>GSTP1</i> <sup>105</sup> Ile. Não houve significado estatístico em relação aos polimorfismos nos genes <i>GSTM1</i> ou <i>GSTT1</i> .	Yang et al (2005)

### 3 - OBJECTIVOS DO TRABALHO

---

Os polimorfismos embora confirmem um risco modesto para doenças complexas como o cancro, se forem comuns podem ser um factor importante, com implicações na prevenção, rastreio, selecção terapêutica e avaliação do prognóstico da doença.

Este trabalho teve como principais objectivos:

- Estudar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* numa população portuguesa.
- Avaliar a associação destes polimorfismos com a susceptibilidade para o cancro da mama.
- Verificar a associação dos polimorfismos com factores de prognóstico para cancro da mama.
- Analisar a associação com a toxicidade hematológica.

Assim, pretendeu-se essencialmente obter marcadores de susceptibilidade para o cancro da mama, marcadores de prognóstico e de selecção terapêutica.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. População estudada

Este estudo foi realizado com doentes com cancro da mama e mulheres sem patologia oncológica, recrutadas desde Setembro de 2005 a Setembro de 2006 no Serviço de Ginecologia da Maternidade Bissaya Barreto (CHC), no Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) e no Hospital Infante Pedro, de Aveiro, após aprovação pelas Comissões de Ética das respectivas Instituições. Todas as doentes recrutadas deram o seu consentimento informado.

Foram estudadas 275 doentes com cancro da mama, comprovado histologicamente e 276 mulheres como grupo controlo, sem patologia oncológica conhecida.

Para cada caso foram colhidos dados sobre o eventual consumo de tabaco ou álcool, a idade da menarca, paridade, idade da primeira gravidez, amamentação, uso de contraceção hormonal, idade da menopausa, uso de terapêutica hormonal de substituição, idade do diagnóstico, tipo histológico do tumor, estadiamento, *status* dos receptores hormonais, *ERBB2*, *TP53*, *Ki67*, grau de diferenciação, invasão linfocelular, terapêuticas efectuadas e efeitos secundários.

As amostras de sangue foram armazenadas a -20°C até à extracção do DNA.

Foram excluídas doentes com estudo genético positivo para mutações no *BRCA1* ou *BRCA2*.

Foi considerada história familiar a existência de pelo menos um antecedente familiar de 1º grau com cancro da mama (mãe, irmã, filha).

As mulheres foram consideradas menopáusicas se tinham tido menopausa espontânea ou cirúrgica, ou se tinham mais de 51 anos de idade.

O IMC foi calculado de acordo com a fórmula standard: peso (Kg)/altura (m)<sup>2</sup>.

## **4.2. Caracterização genotípica**

### **4.2.1. Extração do DNA genómico**

O protocolo de extração foi iniciado a partir de sangue total periférico colhido em tubos de 10 ml com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), seguindo as indicações de Miller (1988) com algumas alterações.

Após se proceder à colheita, o sangue foi imediatamente armazenado a uma temperatura de -20°C.

Procedeu-se ao isolamento de DNA de acordo com métodos que seguidamente se sumarizam.

Após descongelamento, as amostras recolhidas foram tratadas com 40 ml de um tampão de lise de eritrócitos constituída por uma solução de PBS 1x com 0,1% de IGEPAL. Esta solução promove a lise dos eritrócitos e a libertação da hemoglobina. As amostras foram posteriormente colocadas num agitador automático durante 10 minutos e centrifugados a 2500 rpm durante 20 minutos para promover a lise celular.

Desprezou-se o sobrenadante por aspiração e o “*pellet*”, contendo as células nucleadas, foi ressuspenso de novo em 40 ml da mesma solução de lise de eritrócitos.

Repetiram-se as lavagens até à obtenção de sobrenadantes límpidos, sem hemoglobina visível. A seguir o sedimento foi ressuspenso em 1 a 6 ml de um tampão de lise de membranas, constituído por 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH=7,4, e 7M de ureia até completa homogeneização. Adicionou-se SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), num volume correspondente a 1/5 do volume do homogeneizado.

Esta mistura foi deixada a incubar, durante 8 horas, a 37°C, com agitação constante a 100 rpm no Shaker (*Forma Orbital Shaker, Thermo*).

Após incubação, para se proceder à precipitação das proteínas, adicionou-se à mistura uma solução concentrada de NaCl 6mM na proporção de 1 ml para 3,5ml da amostra, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se a 3500 rpm, durante 25 minutos à temperatura ambiente. No final recolheu-se cuidadosamente o sobrenadante e o DNA foi precipitado com a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto. Removeu-se o novelo de DNA com uma pipeta e lavou-se com etanol a 70°.

Finalmente após evaporação do etanol, o DNA foi dissolvido em 200µl de água bidestilada e incubado a 65°C durante 30 min para inactivação de DNases e RNases.

As amostras foram conservadas a -20°C até nova utilização.

#### **4.2.2. Quantificação do DNA**

A quantificação do DNA e a avaliação do grau de pureza da amostra foram efectuadas por espectrofotometria, com leitura das absorvâncias a comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

#### **4.3. Genotipagem dos diferentes genes**

##### **4.3.1. Estudo dos genes GSTM1 e GSTT1**

A presença ou ausência de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi determinada por amplificação simultânea, através da técnica de *Reacção de Polimerização em cadeia (PCR) multiplex*, de forma a obter um fragmento de 215 pb e outro de 480 pb. Como controlo interno da reacção foi co-amplificado um fragmento de 268 pb do gene da  *$\beta$ -globina*.

A reacção foi efectuada num termociclador Mycycler TM (BioRad), num volume final de 25  $\mu$ l, consistindo em aproximadamente 1,5  $\mu$ g de DNA, 0,03 U de Taq DNA polimerase (Amplitaq, BRL), respectivo tampão 1x; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), 5% DMSO e 0,25  $\mu$ M de primers específicos para as regiões dos genes pretendidas (P1) F: 5'GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG 3'. (P2) R : 5' GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTC 3', (P3) F: 5' TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3' e (P4) R: 5' TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3', (P5) F: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' e (P6) R: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'.

As condições da reacção incluíram um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante um minuto,

*annealing* a 58°C durante um minuto e extensão a 72°C durante um minuto, com um passo de extensão final de cinco minutos a 72°C.

A identificação dos fragmentos de DNA foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, num transiluminador de UV (transiluminador UUB, Model TM; 220 V; 50 Hz 90 A). O marcador de peso molecular foi o  $\phi$ X174/HaeIII.

O *Primer P1* e o *P2* ligam-se à sequência do gene *GSTM1*, originando um fragmento de 215 pb. Os *primers P3* e *P4* são específicos para o gene *GSTT1*, amplificando um fragmento de 480 pb. Os *primers P5* e *P6* são específicos para a  $\beta$ -globina.

Este método permite identificar correctamente os indivíduos homocigotos para a deleção, pela ausência de amplificação do segmento específico, na presença de amplificação do segmento do gene da  $\beta$ -globina, mas não permite distinguir os heterocigotos para a presença do gene (figura 3).

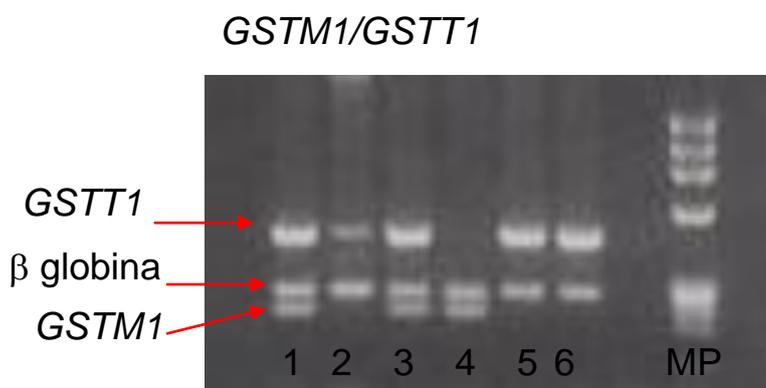


Figura 3 - PCR multiplex: o gene da  $\beta$  globina foi usado como controlo da amplificação; a ausência de amplificação para o *GSTT1* e *GSTM1* (genótipos negativos) identifica os homocigotos para a deleção destes genes (*GSTT1*\*0/\*0 e *GSTM1*\*0/\*0); a presença de amplificação identifica os heterocigotos e homocigotos dos genes (genótipos positivos). As amostras 1 e 3 correspondem a indivíduos *GSTT1* e *GSTM1* positivos; as amostras 2, 5 e 6 correspondem a indivíduos *GSTM1* negativos e *GSTT1* positivos e a amostra 4 corresponde a um indivíduo *GSTT1* negativo e *GSTM1* positivo. MP – marcador de peso molecular  $\phi$ X - 174 *Hae III*.

#### 4.3.2. Estudo do gene GSTP1

##### GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val

A região do gene com o polimorfismo *GSTP1*Ile<sup>105</sup>Val foi amplificada através da técnica de *ARMS*, de forma a obter um fragmento de 275 pb. Como controlo interno da reacção foi co-amplificado um fragmento de 446 pb do gene da interleucina 18.

A reacção foi efectuada num termociclador Mycycler™ (*BioRad*), num volume final de 25 µl, consistindo em aproximadamente 1,5 µg de DNA genómico, 0,03 U de Taq DNA polimerase (*Amplitaq, BRL*) e respectivo tampão da reacção 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de desoxinucleosídeos trifosfato (*dNTP*) (*Pharmacia*) e 0,25 µM de *primers* específicos para a região dos genes pretendidas: (P7) 5' GTG TCA GGT GAG CTC TG 3'; (P8) 5' GGT GTA GAT GAG GGA GAT 3'; (P9) 5' GGT GTA GAT GAG GGA GAC 3'; (P10) 5' CCA ATA GGA CTG ATT ATT CCG CA 3'; (P11) 5' AGG AGG GCA AAA TGC ACT GG 3'.

As condições da reacção incluíram um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante um minuto, annealing a 58°C durante um minuto e extensão a 72°C durante um minuto, com um passo de extensão final durante 5 minutos a 72°C.

A identificação dos fragmentos de DNA foi efectuada por electroforeses em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, num transiluminador de UV (transiluminador UUB, Model TM; 220 V; 50 Hz 90 A).

O *Primer P7* liga-se à sequência do gene *GSTP1* originando em conjunto com o *Primer P8* ou *P9*, um fragmento com 275 pb, que é específico para o gene *GSTP1*. A co-amplificação de um fragmento de 446 pb do gene interleucina 18 pelos primers 10 e 11, serviu como controlo interno da reacção. Como marcador de peso molecular utilizou-se o φX174/HaeIII (Figura 4).

### *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val*

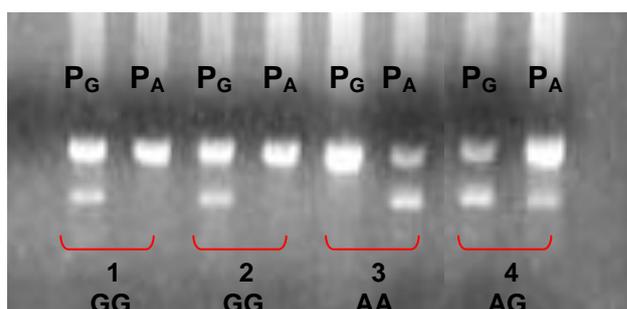


Figura 4 - Identificação do polimorfismo *GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val* por ARMS - Para cada uma das 4 amostras efectuaram-se duas PCRs: a da esquerda com o primer distal (P<sub>G</sub>) que identifica a guanina (P<sub>G</sub>), correspondendo ao alelo *GSTP1<sup>105</sup>Val*; a da direita com o primer distal (P<sub>A</sub>) que identifica a adenina (P<sub>A</sub>), correspondendo ao alelo *GSTP1<sup>105</sup>Ile*. As amostras 1 e 2 correspondem a homozigotas *GSTP<sup>105</sup>Val/Val*; a amostra 3 corresponde a uma homozigota *GSTP<sup>105</sup>Ile/Ile* e a amostra 4 corresponde a uma heterozigota.

### *GSTP1 Ala<sup>114</sup>Val*

Relativamente ao gene *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val*, procedeu-se à amplificação por PCR, de um fragmento de 168 pb seguida da digestão com a enzima de restrição *ACI* (técnica de *RFLPs*).

A reacção foi efectuada num termociclador Mycycler<sup>TM</sup> (BioRad), num volume final de 25 µl, consistindo em aproximadamente 1,5 µg de DNA genómico, 0,03 U de *Taq* DNA polimerase (Amplitaq, BRL) e respectivo tampão da reacção 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de desoxinucleosídeos trifosfato (dNTP) (Pharmacia) e 0,25 µM de primers específicos para a região dos genes pretendidas: (P11) 5' ACA GGA TTT GGT ACT CT 3'; (P12) 5' AGT GCC TTC ACA TAG TCA ATC CTT 3'.

As condições da reacção incluíram um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos para activar a enzima, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, *annealing* a 56°C durante um minuto e extensão a 72°C durante um minuto, com um passo de extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Para a confirmação da amplificação foi efectuada uma electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta,

num transiluminador de UV (transiluminador UUB, Model TM; 220 V; 50 Hz 90A). O marcador de peso molecular foi o  $\phi$ X174/HaeIII.

Para as amostras amplificadas, cerca de 15  $\mu$ l de produto de PCR foram submetidos a digestão enzimática com 15 U da enzima de restrição *Aci*I e respectivo tampão de reacção à temperatura de 37°C durante a noite. Os fragmentos obtidos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. O produto de PCR de 170 pb é digerido pela enzima se o alelo estiver presente, originando dois fragmentos de 144 e 26 pb (Figura 5).

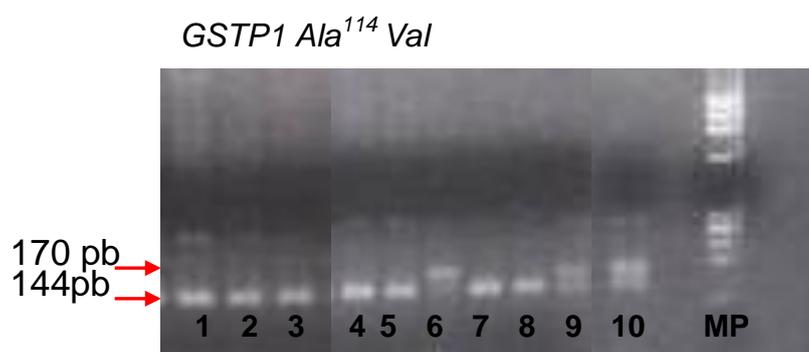


Figura 5 - Identificação dos genótipos correspondentes ao polimorfismo *GSTP1 Ala<sup>114</sup> Val* por RFLP, após digestão com *Aci*I: as amostras 1-5, 7 e 8 correspondem a homozigotas para o alelo *GSTP1<sup>114</sup>Ala*; a amostra 6 corresponde a uma homozigota para o alelo *GSTP1<sup>114</sup>Val*; as amostras 9 e 10 correspondem a heterozigotas. A banda de 26 pb não se visualiza. MP – marcador de peso molecular  $\phi$ X -174 *Hae III*.

#### **4.4. Análise estatística**

A análise estatística foi feita com o Programa *Statistical Package for Social Sciences SPSS versão 16.0*. O valor de *Odds Ratio (OR)* e o seu Intervalo de Confiança de 95% (95% IC) foram calculados como uma medida da associação entre alelos e genótipos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e o risco para cancro da mama.

A avaliação das médias e frequências foi efectuada pelo *teste t-Student* para variáveis contínuas (idade) ou pelo teste *chi-squared test*, quando indicado e foi considerado estatisticamente significativo se  $p < 0,05$ .

## 5 - RESULTADOS

### 5.1. Análise epidemiológica

Neste estudo estiveram envolvidas 275 doentes com cancro da mama e 276 mulheres do grupo controlo sem doença oncológica conhecida, sendo todas as mulheres de raça caucasiana.

Na tabela VII representam-se alguns factores de risco para cancro da mama.

**Tabela VII- Características das populações das mulheres com cancro da mama e do grupo controlo**

Características	Doentes (n=275)	Controlos (n=276)	<i>p</i>
Idade (média; dp)	59,7; 11,03	58,7; 13,23	NS
Idade média da menarca (média; dp)	13,16; 1,51	13,24; 1,86	NS
Pré-menopausa	80 (29,0%)	81 (29,3%)	NS
Pós-menopausa	195 (70,9%)	195 (70,6%)	
Paridade			NS
0	29 (10,5%)	22 (7,9%)	
1	76 (27,6%)	66 (24,0%)	
≥ 2	168 (61,0%)	187 (67,7%)	
Amamentação			NS
Sim	198 (72,0%)	177 (64,1%)	
Não	69 (25,0%)	87 (31,5%)	
Uso de C.H.			NS
Sim	118 (42,9%)	113 (40,9%)	
Não	152 (55,2%)	157 (56,8%)	
Uso de THS			NS
Sim	47 (17,0%)	58 (21,0%)	
Não	182 (66,1%)	131 (47,4%)	
Consumo de tabaco			NS
Sim	18 (6,5%)	13 (4,7%)	
Não	255 (92,7%)	261 (94,5%)	
H. Familiar de cancro da mama			NS
Sim	45 (16,3%)	52 (18,8%)	
Não	230 (83,6%)	220 (79,7%)	

NS - se  $p >$  ou igual a 0,05

Dp – desvio padrão

THS – terapêutica hormonal de substituição

CH – contraceção hormonal

No grupo das doentes a média das idades foi 59,7 anos (desvio padrão;11,03) e a média das idades das mulheres do grupo controlo foi 58,7 anos (desvio padrão; 13,23).

Não houve diferenças significativas entre os dois grupos, nomeadamente em relação à idade, estado hormonal, idade da menarca ou paridade ( $p>0,05$ ).

Na altura do diagnóstico 80 doentes (29%) eram pré-menopáusicas e 195 (70,9%) eram pós-menopáusicas. Destas, 24% tinham feito previamente terapêutica hormonal de substituição (THS).

O uso de contraceção hormonal foi semelhante entre o grupo de doentes e o grupo controlo, como mostra a Tabela V. O consumo de tabaco não se associou a um aumento de risco para cancro da mama.

## **5.2. Caracterização dos tumores**

A média da idade na altura do diagnóstico de cancro da mama foi 54,6 com desvio padrão de 11,84.

O diagnóstico histológico foi feito através de biópsias ou peças operatórias. A tabela VIII mostra a frequência dos tipos histológicos do cancro da mama, tendo sido o carcinoma ductal invasivo o mais frequente (77%), seguido do carcinoma lobular invasivo (10,9%).

**Tabela VIII - Frequência dos tipos histológicos do cancro da mama**

<b>Tipo Histológico</b>	<b>Nº de doentes</b>	<b>%</b>
Ductal	212	77,0
Lobular	30	10,9
CDIS	8	2,9
Mucinoso	6	2,1
Papilar	5	1,8
Outros*	14	5,0

\*inclui carcinoma medular, indiferenciado, apócrino, secretor e misto

Em relação ao estadiamento, (Tabela IX) 51,6% das doentes foram classificadas no estadio II. A grande maioria dos tumores foi diagnosticado em estadios mais precoces (83,1% nos estadios 0, I e II).

**Tabela IX - Frequência de doentes em cada estágio**

<b>Estadiamento do cancro da mama</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Tis	9	3,2
Estadio I	78	28,3
Estadio II	142	51,6
Estadio III	34	12,3
Estadio IV	6	2,1
Desconhecido	6	2,1

As características dos tumores em relação ao grau de diferenciação (G1, G2 ou G3), receptores de estrogénios e de progesterona, TP53, Ki 67, ERBB2 e invasão linfo-vascular estão representadas na tabela X.

**Tabela X - Características do tumor**

<b>Cancro da mama ( n= 275)</b>				
<b>Grau de diferenciação</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>NA</b>
(n / %)	103 (37,4%)	114 (41,4%)	35 (12,7%)	23 (8,3%)
<b>RE</b>	<b>positivos</b>	<b>negativos</b>		<b>NA</b>
(n / %)	168 (61,0%)	69 (25,0%)		38 (13,8%)
<b>RP</b>	<b>positivos</b>	<b>negativos</b>		<b>NA</b>
(n / %)	135 (49,0%)	90 (32,7%)		50 (18,1%)
<b>ERBB2</b>	<b>positivo</b>	<b>negativo</b>		<b>NA</b>
(n / %)	52 (18,9%)	161 (58,5%)		62 (22,5%)
<b>TP53</b>	<b>positivo</b>	<b>negativo</b>		<b>NA</b>
(n / %)	29 (10,5%)	138 (50,1%)		108 (39,2%)
<b>Ki67</b>	<b>positivo</b>	<b>negativo</b>		<b>NA</b>
(n / %)	23 (8,3%)	37 (13,4%)		215 (78,1%)
<b>Invasão linfo-vascular</b>	<b>sim</b>	<b>não</b>		<b>NA</b>
(n / %)	53 (19,2%)	170 (61,8%)		52 (18,9%)

NA – dados não avaliados/indisponíveis; RE - receptores de estrogénio; RP - receptores de progesterona

O facto de haver uma percentagem elevada de dados não avaliados/indisponíveis em relação a TP53, Ki67 e sobreexpressão do ERBB2, deve-se ao facto de o estudo ter

englobado doentes com diferentes *follow-up* (variou entre 9 e 304 meses) e estes dados imunohistoquímicos terem começado a ser determinados só nos últimos anos.

Na maioria dos casos, os tumores eram moderadamente diferenciados ou bem diferenciados (41,4% e 37,4%, respectivamente) e a maioria tinha receptores de estrogénio e/ou progesterona positivos. Como era de esperar uma minoria apresentava uma sobreexpressão de ERBB2 (18,9%)

Mais de metade das doentes (59,6%) foram submetidas a quimioterapia, 23,27% a quimioterapia e radioterapia e 10,1 % só a radioterapia (a maioria como complemento da cirurgia conservadora). A grande maioria (80%) foi medicada com hormonoterapia - tamoxifeno ou inibidores da aromatase (Tabela XI).

**Tabela XI - Tipos de tratamento do cancro da mama**

<b>Tipos de tratamento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Quimioterapia	164	59,63
Quimioterapia + RT	64	23,27
Radioterapia	28	10,1
Hormonoterapia	220	80

### **5.3. Frequências alélicas e genótípicas**

#### **5.3.1. Polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1***

O grupo controlo, constituído por 276 mulheres apresentou frequências genótípicas de 47,8% relativamente ao genótipo *GSTM1*\*0/0 e 23,1% relativamente ao genótipo *GSTT1*\*0/0.

O grupo de doentes com cancro da mama, constituído por 275 mulheres, apresentou frequências genótípicas de 53% relativamente ao genótipo *GSTM1*\*0/0 e 25% relativamente ao genótipo *GSTT1*\*0/0 (Tabela XII).

O genótipo *GSTM1\*0/0* associou-se a um aumento de risco para cancro da mama 1,24 vezes superior em relação ao genótipo *GSTM1 presente*, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (OR = 1,24; 95% IC = 0,88-1,74).

A mesma tendência foi verificada para o genótipo *GSTT1\*0/0*, também sem significado estatístico (OR=1,12; 95% IC = 0,75-1,65).

**Tabela XII - Frequências genótípicas dos polimorfismos do *GSTM1* e *GSTT1* no grupo de doentes com cancro da mama e no grupo controlo.**

	Doentes (n / %)		Controlos (n / %)		OR (95% IC)
<i>GSTM1</i>					
<i>nulo</i>	146	(53,0%)	133	(47,8%)	<b>1,24 (0,88 - 1,74)</b>
<i>presente</i>	124	(45%)	140	(51%)	
<i>GSTT1</i>					
<i>nulo</i>	69	(25,0%)	64	(23,1%)	1,12 (0,75-1,65)
<i>presente</i>	201	(73,0%)	208	(75,3%)	

*GSTM1* e *GSTT1* *nulos* significa que são homozigotos para a deleção

### 5.3.2. Polimorfismo *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val*:

As frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* estão descritas na tabela XIII.

O grupo controlo apresentou frequências genótípicas de 34,7%, 45,6% e 17,3% relativamente aos genótipos *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile*, *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val*, respectivamente.

Para o grupo das doentes com cancro da mama, as frequências genótípicas foram de 39,6%, 49,0% e 10,5%, relativamente aos genótipos *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile*, *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val*, respectivamente.

O genótipo *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* associou-se a uma menor susceptibilidade para cancro da mama quando comparado com os genótipos *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile* (OR = 0,55; 95% IC = 0,33-0,90).

**Tabela XIII - Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos genes *GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val* no grupo de doentes com cancro da mama e no grupo controlo.**

	Doentes n (%)		Controlos n (%)		OR (95% IC)
<b>Genótipos</b>					
<b><i>GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val</i></b>					
Ile/Ile (AA)	109	(39,6%)	96	(34,7%)	1,20 (0,85 - 1,71)
Ile/Val (AG)	135	(49,0%)	126	(45,6%)	1,12 (0,80 - 1,57)
Val/Val (GG)	29	(10,5%)	48	(17,3%)	<b>0,55 (0,33 - 0,90)</b>
<i>Ile/Ile + Ile/Val</i>	244	(88,7%)	222	(80,4%)	<b>1,82 (1,11-2,99) p&lt;0,02</b>
<b>Alelos</b>					
<i>GSTP1<sup>105</sup>Ile</i>	353	(64,6%)	318	(58,8%)	<b>1,28 (1,00-1,63) p&lt;0,05</b>
<i>GSTP1<sup>105</sup>Val</i>	193	(35,3%)	222	(41,1%)	0,78 (0,61-1,00)

Inversamente, a presença de pelo menos um alelo *GSTP1<sup>105</sup>Ile* (homozigoto ou heterozigoto) associa-se a um aumento do risco para cancro da mama de 1,8 vezes em relação às mulheres com genótipo *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* (OR=1,82; 95% IC = 1,11 - 2,99).

Confirmando os dados anteriores, a comparação das distribuições alélicas de *GSTP1<sup>105</sup>Ile* entre as doentes e os controlos revelou um aumento da frequência do alelo *GSTP1<sup>105</sup>Ile* na população com cancro da mama (64,6% vs 58,8%) com OR=1,28 (95% IC =1,00-1,63).

### 5.3.3. Polimorfismo *GSTP1 Ala<sup>114</sup>Val*:

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* estão descritas na tabela XIV.

O grupo controlo apresentou frequências genotípicas de 73,5%, 4,3% e 2,1% relativamente aos genótipos *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala*, *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Val* e *GSTP1<sup>114</sup>Val/Val*, respectivamente.

O grupo das doentes com cancro da mama, apresentou frequências genotípicas de 83,2%, 7,2% e 1,8% relativamente aos genótipos *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala*, *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Val* e *GSTP1<sup>114</sup>Val/Val*, respectivamente.

O número de mulheres homozigotas para *GSTP1*<sup>114</sup>*Val/Val* foi muito reduzido para análise isolada, pelo que se avaliou conjuntamente com as heterozigotas *GSTP1*<sup>114</sup>*Ala/Val*. Este grupo associou-se a um aumento de risco de 1,22 vezes para cancro da mama, contudo esta diferença não teve significado estatístico (OR = 1,22; 95% IC = 0,65-2,30).

**Tabela XIV- distribuição e frequências genóticas e alélicas dos genes *GSTP1Ala*<sup>114</sup>*Val* no grupo de doentes com cancro da mama e no grupo controlo.**

	Doentes n (%)		Controlos n (%)		OR (95% IC)	
<b>Genótipos</b>						
<b><i>GSTP1Ala</i><sup>114</sup><i>Val</i></b>						
<i>Ala/Ala (CC)</i>	229	(83,2%)	201	(73,5%)	0,82	(0,43-1,55)
<i>Ala/Val (CT)</i>	20	(7,2%)	12	(4,3%)	1,47	(0,70-3,09)
<i>Val/Val (TT)</i>	5	(1,8%)	6	(2,1%)	0,71	(0,21-2,37)
<i>Ala/Val + Val/Val</i>	25	(9%)	18	(6,5%)	<b>1,22</b>	<b>(0,65-2,30)</b>
<b>Alelos</b>						
<i>GSTP1</i> <sup>114</sup> <i>Ala</i>	478	(94,0%)	414	(94,5%)	0,92	(0,53-1,61)
<i>GSTP1</i> <sup>114</sup> <i>Val</i>	30	(5,9%)	24	(5,4%)	1,08	(0,62-1,88)

A comparação das distribuições alélicas de *GSTP1Ala*<sup>114</sup>*Val* entre as doentes e os controlos não revelou alterações na frequência dos alelos.

#### **5.4. Associação entre genótipos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e o estado hormonal**

Avaliou-se o risco de cancro da mama associado aos diferentes polimorfismos genéticos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* estratificado pelo estado hormonal na altura do diagnóstico. Verificou-se que *GSTM1*\*0/0 estava associado a um aumento de risco de 1,34 vezes para cancro da mama nas mulheres pós-menopáusicas, não atingindo significado estatístico (OR=1,34; 95% IC 0,90-2,00). Esta associação não se verificou nas mulheres pré-menopáusicas (OR = 0,76; 95% IC (0,38-1,55)).

Dado o número reduzido de mulheres homocigotas para *Val/Val* estas foram estudadas conjuntamente com as heterocigotas.

**Tabela XV - Distribuição e frequências genóticas dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em mulheres pré-menopáusicas e pós-menopáusicas**

Genótipos	Pré-menopausa			Pós -menopausa		
	Doentes n (%)	Controlos n (%)	OR (95% IC)	Doentes n (%)	Controlos n (%)	OR (95% IC)
<i>GSTM1</i>						
<i>presente</i>	36 (13,0%)	22 (7,9%)	0,76 (0,38-1,55)	88 (32%)	99 (35,8%)	<b>1,34 (0,90-2,00)</b>
<i>nulo</i>	40 (14,5%)	32 (11,5%)		106 (38,5%)	89 (32,2%)	
<i>GSTT1</i>						
<i>presente</i>	59 (21,4%)	45 (16,3%)	1,44 (0,59-3,53)	142 (51,6%)	145 (52,5%)	1,26 (0,79-2,02)
<i>nulo</i>	17 (6,1%)	9 (3,2%)		52 (18,9%)	42 (15,2%)	
<i>GSTP1Ile<sup>105</sup>Val</i>						
<i>Ile/Ile</i>	34 (12,3%)	21 (7,6%)	0,84 (0,42-1,71)	75 (27,2%)	62 (22,4%)	0,81 (0,53-1,23)
<i>Ile/Val + Val/Val</i>	45 (16,3%)	33 (11,9%)		119 (43,2%)	122 (44,2%)	
<i>GSTP1Ala<sup>114</sup>Val</i>						
<i>Ala/Ala</i>	65 (23,6%)	36 (13,0%)	0,74 (0,24-2,30)	164 (59,6%)	139 (50,3%)	1,20 (0,55-2,60)
<i>Ala/Val + Val/Val</i>	8 (2,9%)	6 (2,1%)		17 (6,1%)	12 (0,7%)	

*GSTM1* e *GSTT1* nulos significa que são homocigotos para a deleção

Em relação ao genótipo *GSTT1*\*0/0, verificou-se que havia um aumento de risco para cancro da mama de 1,44 vezes nas mulheres pré-menopáusicas e 1,26 vezes na pós-menopausa, embora sem significado estatístico (OR = 1,44; 95% IC = 0,59-3,53 e OR = 1,26; 95% IC = 0,79-2,02, respectivamente).

A associação dos genótipos *GSTM1*\*0/0 e *GSTT1*\*0/0 na pré-menopausa não mostrou aumento de risco para cancro da mama (OR = 0,98; 95% IC = 0,59-1,63), mas na pós-menopausa verificou-se um aumento de risco para cancro da mama com OR = 1,28; 95% IC = 0,95-1,72).

Em relação aos polimorfismos *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* e *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* não se verificou aumento de risco com significado estatístico na pré-menopausa ou na pós-menopausa para os diferentes genótipos.

### **5.5. Associações genotípicas**

Investigou-se se a associação dos diferentes genótipos estava relacionada com um aumento de risco de cancro da mama.

A Tabela XVI mostra o risco de cancro da mama para algumas combinações de genótipos mais frequentes.

A associação de genótipos mais frequente nas doentes com cancro da mama foi *GSTM1\*0/0 + GSTT1 presente + GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val + GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala*, que surgiu em 16,7% das doentes, enquanto que nas mulheres do grupo controlo, a associação mais frequente foi *GSTM1 presente + GSTT1 presente + GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile + GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala*, que esteve presente em 12,6% das mulheres.

Nenhuma das associações teve diferenças com significado estatístico em relação ao risco de cancro da mama. Curiosamente, a associação com tendência para um maior risco para esta doença foi *GSTM1\*0/0 + GSTT1\*0/0 + GSTP1<sup>105</sup>Val/Val + GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala* (OR=1,76; 95% IC=0,43-7,12), e para um menor risco foi a associação *GSTM1 presente + GSTT1 presente + GSTP1<sup>105</sup>Val/Val + GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala* (OR=0,45; 95% IC= 0,18-1,15), o que sugere a maior importância dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* como condicionantes para um maior risco para cancro da mama.

Se avaliarmos apenas a associação dos genótipos *GSTM1\*0/0* e *GSTT1\*0/0*, verifica-se um aumento de risco para cancro da mama de 1,17 vezes (95% IC=0,91-1,49), com um valor muito próximo do significado estatístico.

**Tabela XVI - Associação entre combinação de genótipos dos GSTs e risco de cancro da mama**

<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>	<i>GSTP1</i> <sup>105</sup>	<i>GSTP1</i> <sup>114</sup>	Doentes (n° / %)	Controlos (n° / %)	OR (95% IC)
<i>presente</i>	<i>presente</i>	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ala/Ala</i>	34 (12,3%)	30 (10,8%)	1,05 (0,62-1,79)
<i>presente</i>	<i>presente</i>	<i>Ile/Val ou Val/Val</i>	<i>Ala/Val e Val/Val</i>	<b>37 (13,4%)</b>	<b>35 (12,6%)</b>	<b>0,90 (0,54-1,50)</b>
<i>presente</i>	<i>presente</i>	<i>Val/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	<b>7 (2,5%)</b>	<b>13 (4,7%)</b>	<b>0,45 (0,18-1,15)</b>
<i>nulo</i>	<i>presente</i>	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ala/Ala</i>	34 (12,3%)	34 (12,3)	0,85 (0,50-1,42)
<i>nulo</i>	<i>presente</i>	<i>Ile/Val ou Val/Val</i>	<i>Ala/Val e Val/Val</i>	4 (1,4%)	6 (2,1%)	0,57 (0,16-2,06)
<i>nulo</i>	<i>presente</i>	<i>Ile/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	<b>46 (16,7%)</b>	<b>30 (10,8%)</b>	<b>1,42 (0,85-2,35)</b>
<i>nulo</i>	<i>presente</i>	<i>Val/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	9 (3,2%)	10 (3,6%)	0,77 (0,31-1,94)
<i>presente</i>	<i>nulo</i>	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ala/Ala</i>	9 (3,2%)	7 (2,5%)	1,12 (0,41-3,07)
<i>presente</i>	<i>nulo</i>	<i>Ile/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	13 (4,7%)	8 (2,8%)	1,44 (0,58-3,54)
<i>nulo</i>	<i>nulo</i>	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ala/Ala</i>	13 (4,7%)	8 (2,8%)	1,44 (0,58-3,54)
<i>nulo</i>	<i>nulo</i>	<i>Ile/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	17 (6,1%)	15 (5,4%)	0,98 (0,48-2,02)
<i>nulo</i>	<i>nulo</i>	<i>Val/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	<b>6 (2,1%)</b>	<b>3 (1,0%)</b>	<b>1,76 (0,43-7,12)</b>

*GSTM1* e *GSTT1* nulos significa que são homozigotos para a deleção

A maioria das doentes tinha deleção em homozigotia em pelo menos um gene (*GSTM1* ou *GSTT1*), o que sugere que a maioria destas mulheres não têm uma actividade em pleno das GSTs, apresentando níveis individuais variáveis na actividade destas enzimas.

Avaliou-se o efeito da presença de pelo menos uma deleção em homozigotia em *GSTM1* e/ou *GSTT1* (*GSTM1*\*0/0 e/ou *GSTT1*\*0/0) na susceptibilidade para cancro da mama, em relação à ausência de qualquer deleção em homozigotia nestes genes e concluiu-se que houve um aumento de risco de 1,25 vezes (95% IC=0,84-1,85).

## **5.6. Associação entre os polimorfismos genéticos e as características do tumor**

Um dos objectivos do trabalho foi avaliar se havia algum tipo de interferência dos polimorfismos na gravidade do cancro da mama, nomeadamente em relação ao estadiamento e características biológicas consideradas como factores de prognóstico para a doença: grau de diferenciação, receptores hormonais, sobreexpressão do ERBB2, Ki67, TP53 e invasão linfo-vascular.

Na tabela XVII está representada a distribuição dos diferentes estadios do cancro da mama pelos diferentes genótipos.

**Tabela XVII - estadiamento do cancro da mama e os genótipos dos GSTs**

<i>Genótipos</i>	<b>Estádio 0</b>	<b>Estádio I</b>	<b>Estádio II</b>	<b>Estádio III</b>	<b>Estádio IV</b>
<i>GSTM1</i>					
<i>nulo</i>	4 (1,4%)	36 (13,0%)	78 (28,3%)	20 (7,2%)	3 (1,0%)
<i>presente</i>	5 (1,8%)	41 (14,9%)	61 (22,1%)	14 (5,0%)	3 (1,0%)
<i>GSTT1</i>					
<i>nulo</i>	4 (1,4%)	17 (6,1%)	36 (13,0%)	8 (2,9%)	2 (0,7%)
<i>presente</i>	5 (1,8%)	60 (21,8%)	103 (37,4%)	26 (9,4%)	4 (1,4%)
<i>GSTP1 Ala<sup>114</sup> Val</i>					
<i>Ala/Ala</i>	8 (2,9%)	66 (24%)	117 (42,5%)	28 (10,1%)	6 (2,1%)
<i>Ala/Val + Val/Val</i>	1 (0,3%)	8 (2,9%)	12 (4,3%)	3 (1,0%)	0 (0%)
<i>GSTP1 Ile<sup>105</sup> Val</i>					
<i>Ile/Ile</i>	2 (0,7%)	29 (10,5%)	63 (22,9%)	13 (4,7%)	2 (0,7%)
<i>Ile/Val + Val/Val</i>	8 (2,9%)	48 (17,4%)	78 (28,3%)	22 (8,0%)	4 (1,4%)

*GSTM1* e *GSTT1* nulos significa que são homocigotos para a deleção

Numa primeira fase fez-se a comparação entre os diferentes genótipos e a frequência de casos de cancro da mama no estadio 0/I e o estadio II.

O genótipo *GSTM1*\*0/0 esteve associado a uma tendência para estadios mais avançados (OR=1,47; 95% IC = 0,86-2,52), como mostra a Tabela XVIII.

**Tabela XVIII - Variação do estadiamento da doença com os diferentes genótipos**

Estadiamento						
<i>Genótipos</i>	<b>0 / I</b> n (%)	<b>II</b> n (%)	<b>OR</b> (95%IC)	<b>0 / I / II</b> n (%)	<b>III / IV</b> n (%)	<b>OR</b> (95%IC)
<i>GSTM1</i>						
<i>nulo</i>	40 (14,5%)	78 (28,3%)	<b>1,47</b>	118 (42,9%)	23 (8,3%)	<b>1,23</b>
<i>presente</i>	46 (16,7%)	61 (22,1%)	<b>(0,86-2,52)</b>	107 (38,9%)	17 (6,1%)	<b>(0,62-2,42)</b>
<i>GSTT1</i>						
<i>nulo</i>	21 (7,6%)	36 (13,0%)	1,08	57 (20,7%)	10 (3,6%)	0,98
<i>presente</i>	65 (23,6%)	103 (37,4%)	(0,58-2,01)	168 (61,0%)	30 (10,9%)	(0,45-2,14)
<i>GSTP1Ala<sup>114</sup> Val</i>						
<i>Ala/Ala</i>	74 (26,9%)	117 (42,5%)	0,84	191 (69,4%)	34 (12,3%)	0,80
<i>Ala/Val e Val/Val</i>	9 (3,2%)	12 (4,3%)	(0,34-2,10)	21 (7,6%)	3 (1,0%)	(0,23-2,84)
<i>GSTP1Ile<sup>105</sup> Val</i>						
<i>Ile/Ile</i>	31 (11,2%)	63 (22,9%)	0,69	94 (34,1%)	15 (5,4%)	1,22
<i>Ile/Val e Val/Val</i>	56 (20,3%)	78 (28,3%)	(0,40-1,19)	134 (48,7%)	26 (9,4%)	(0,61-2,42)

*GSTM1* e *GSTT1* nulos significa que são homozigotos para a deleção

Os restantes genótipos não se associaram de forma significativa do ponto de vista estatístico com a gravidade do estadiamento do cancro da mama.

Ao comparar os estadios menos graves 0/I e II com os estadios III/IV para os diferentes genótipos, verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa, embora se tenha registado novamente tendência para a associação do genótipo *GSTM1*\*0/0 aos estadios mais avançados (OR=1,23; 95% IC=0,62-2,42).

Em relação à invasão ganglionar axilar o genótipo *GSTM1*\*0/0 foi o que apresentou maior tendência para estar associado a gânglios axilares positivos e o que se aproximou mais da significância estatística (OR=1,49; 95% IC=0,89-2,50). Nenhum dos outros polimorfismos teve significado estatístico: *GSTT1*\*0/0 (OR=1,07; 95% IC=0,59-1,94), *GSTP1Ile<sup>105</sup> Val* (OR=1,33; 95% IC=0,78-2,26) ou *GSTP1Ala<sup>114</sup> Val* (OR=0,82; 95% IC=0,34-1,95).

Avaliou-se o risco para tumores bem diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2) e pouco diferenciados (G3) em relação aos diferentes genótipos (Tabela XIX). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes genótipos e apenas para *GSTP1Ile<sup>105</sup> Val* o genótipo em heterozigotia ou homozigotia para *Val* mostrou tendência para um aumento de risco para cancros com menor grau de diferenciação (OR=1,29; 95% IC=0,76-2,17).

Analisou-se igualmente, o risco para tumores com receptores de estrogénios e progesterona negativos em relação aos diferentes genótipos (Tabela XIX).

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes genótipos e apenas para o polimorfismo *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* o genótipo em heterozigotia ou homozigotia para *Val* apresentou uma maior associação com os receptores de estrogénio e progesterona negativos (OR=1,65; 95% IC=0,68-4,05 e OR=1,41; 95% IC=0,57-3,50, respectivamente). O genótipo *GSTM1\*0/0* também mostrou maior tendência para se associar a receptores de progesterona negativos (OR=1,24; 95% IC=0,72-2,13).

**Tabela XIX- Variação do grau de diferenciação e receptores hormonais com os diferentes polimorfismos genéticos**

Genótipos	Grau de diferenciação			OR (95% IC)	R.E.		OR (95% IC)	R.P.		OR (95% IC)
	G1	G2	G3		pos	neg		pos	neg	
<i>GSTM1</i> <i>nulo</i>	49 (20%)	67 (27,4%)	21 (8,6%)	0,61 (0,37-1,02)	93 (40%)	32 (13,7%)	0,68 (0,38-1,20)	68 (30,9%)	50 (22,7%)	<b>1,24</b> <b>(0,72-2,13)</b>
<i>presente</i>	51 (20,9%)	42 (17,2%)	14 (5,7%)		71 (30,6%)	36 (15,5%)		64 (29%)	38 (17,2%)	
<i>GSTT1</i> <i>nulo</i>	24 (9,7%)	32 (12,9%)	9 (3,6%)	0,82 (0,46-1,46)	42 (18,1%)	16 (6,8%)	0,89 (0,46-1,73)	37 (16,8%)	19 (8,6%)	0,71 (0,37-1,33)
<i>presente</i>	76 (30,7%)	80 (32,3%)	26 (10,5%)		122 (52,5%)	52 (22,4%)		95 (43,1%)	69 (31,3%)	
<i>GSTP1Ala<sup>114</sup>Val</i> <i>Ala/Ala</i>	83 (34,8%)	96 (40,3%)	29 (12,1%)	0,87 (0,39-1,93)	139 (64,3%)	54 (25%)	<b>1,65</b> <b>(0,68-4,05)</b>	112 (54,6%)	72 (35,1%)	<b>1,41</b> <b>(0,57-3,50)</b>
<i>Ala/Val + Val/Val</i>	11 (4,6%)	10 (4,2%)	9 (3,7%)		14 (6,4%)	9 (4,1%)		11 (5,3%)	10 (4,8%)	
<i>GSTP1Ile<sup>105</sup>Val</i> <i>Ile/Ile</i>	36 (14,4%)	46 (18,4%)	15 (6%)	1,29 (0,76-2,17)	67 (28,5%)	26 (11%)	1,12 (0,63-1,99)	53 (23,7%)	36 (16,1%)	0,99 (0,58-1,72)
<i>Ile/Val + Val/Val</i>	66 (26,4%)	67 (26,8%)	20 (8%)		99 (42,1%)	43 (18,2%)		80 (35,8%)	54 (24,2%)	

*GSTM1* e *GSTT1* nulos significa que são homozigotos para a deleção.

*RE* - receptores de estrogénio; *RP* - receptores de progesterona. *G1*- tumores bem diferenciados, *G2*- moderadamente diferenciados, *G3*- pouco diferenciados.

Na tabela XX apresentam-se os dados relativos à avaliação do risco para tumores com sobreexpressão do ERBB2, TP53 positivo, Ki67 positivo e com a invasão linfo-vascular relativamente aos diferentes genótipos.

Verificou-se que o genótipo *GSTM1*\*0/0 se associou a uma maior probabilidade dos tumores serem TP53 positivos (OR=3,00; 95% IC=1,24-7,25) e Ki67 positivos (OR=3,17; 95% IC=1,06-9,52). Este genótipo apresentou ainda um risco maior dos tumores serem ERBB2 positivos (OR=1,48; 95% IC=0,78-2,81) e de apresentarem invasão linfo-vascular (OR=1,16; 95% IC=0,63-2,16), embora não atingindo significado estatístico. Em relação ao polimorfismo do *GSTP1*Ile<sup>105</sup>Val em heterozigotia ou homozigotia para o alelo Val houve um aumento de 1,54 vezes de tumores com sobreexpressão de ERBB2 (OR=1,54; 95% IC=0,80-2,97) e um aumento de 1,53 vezes de invasão linfo-vascular (OR=1,53; 95% IC=0,80-2,92), também sem atingir significado estatístico.

**Tabela XX - Variação do ERBB2, TP53, Ki67 e invasão linfo-vascular com os diferentes polimorfismos no cancro da mama.**

<i>Genótipos</i>	<b>ERBB2</b>		<b>OR (95% IC)</b>	<b>TP53</b>		<b>OR (95% IC)</b>	<b>Ki67</b>		<b>OR (95% IC)</b>	<b>invasão linfo-vascular</b>		<b>OR (95% IC)</b>
	<b>pos</b>	<b>neg</b>		<b>pos</b>	<b>neg</b>		<b>pos</b>	<b>neg</b>		<b>Sim</b>	<b>Não</b>	
<i>GSTM1</i> <i>nulo</i>	32 (15,3%)	81 (38,9%)	<b>1,48 (0,78-2,81)</b>	21 (12,8%)	63 (38%)	<b>3,00 (1,24-7,25)</b> <b>p = 0,02</b>	15 (25,8%)	13 (22%)	<b>3,17 (1,06-9,52)</b> <b>p &lt; 0,04</b>	28 (12,8%)	81 (37%)	<b>1,16 (0,63-2,16)</b>
<i>presente</i>	20 (9,6%)	75 (36%)		8 (4,8%)	72 (44%)		8 (13%)	22 (38%)		25 (11%)	84 (38,5%)	
<i>GSTT1</i> <i>nulo</i>	13 (6%)	39 (18,7%)	1,00 (0,48-2,06)	8 (4%)	33 (20,1%)	1,18 (0,48-2,9)	7 (12%)	7 (12%)	<b>1,75 (0,52-5,89)</b>	12 (5,5%)	44 (20%)	0,80 (0,39-1,67)
<i>presente</i>	39 (18,7%)	117 (56%)		21 (12,8%)	102 (62%)		16 (27,5%)	28 (48%)		41 (19%)	121 (55,5%)	
<i>GSTPIAla<sup>114</sup>Val</i> <i>Ala/Ala</i>	44 (22,4%)	130 (66,3%)	0,87 (0,30-2,49)	21 (13,8%)	114 (75%)	2,26 (0,72-7,09)	17 (27,8%)	27 (44%)	1,11 (0,36-3,48)	47 (23%)	135 (66,1%)	0,84 (0,30-2,42)
<i>Ala/Val + Val/Val</i>	5 (2,5%)	17 (8,6%)		5 (3,2%)	12 (7,8%)		7 (11,4%)	10 (16%)		5 (2,45%)	17 (8,3%)	
<i>GSTP1Ile<sup>105</sup>Val</i> <i>Ile/Ile</i>	17 (8%)	68 (32,2%)	<b>1,54 (0,80-2,97)</b>	16 (9,6%)	58 (35%)	0,60 (0,27-1,34)	12 (19,6%)	14 (23%)	0,61 (0,22-1,72)	18 (8,1%)	74 (33,4%)	<b>1,53 (0,80-2,92)</b>
<i>Ile/Val + Val/Val</i>	35 (16,5%)	91 (43%)		13 (7,8%)	79 (47,5%)		12 (19,6%)	23 (38%)		35 (16%)	94 (42,5%)	

*GSTM1* e *GSTT1* nulos significa que são homozigotos para a deleção

### **5.7. Influência dos polimorfismos genéticos na toxicidade hematológica**

Um dos efeitos mais nefastos e que pode pôr em risco a vida das doentes submetidas a quimioterapia é a toxicidade hematológica por mielossupressão, sendo mais frequente a leucopenia e anemia e mais rara a trombocitopenia.

Neste estudo usaram-se os critérios de toxicidade do ECOG (anexo II).

Dos 275 casos em que se estudou o genótipo, 164 mulheres foram submetidas a quimioterapia. Os citostáticos mais usados foram a epirrubicina (79,8%), a ciclofosfamida (68,2%), o 5-fluoracilo (62,8%) e os taxanos (35,3%), (Tabela XXI).

**Tabela XXI - Tipo de citostáticos mais usados**

<b>Citostáticos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Epirrubicina	131	79,8
Ciclofosfamida	112	68,2
5 - Fluoracilo	103	62,8
Taxanos	58	35,3
Total	404	

Actualmente, dispomos de um número muito escasso de trabalhos sobre a farmacogenética de citostáticos usados no tratamento do cancro da mama. Na prática clínica, continuamos sem conseguir prever quais as doentes que, para doses *standard* ou protocoladas de diferentes esquemas de quimioterapia, irão desenvolver toxicidade, nomeadamente hematológica, a qual pode resultar em situações graves ou mesmo fatais.

Por este motivo, avaliou-se a eventual influência dos polimorfismos em estudo na toxicidade hematológica decorrente da quimioterapia. Os dados estão descritos na Tabela XXII.

Em relação ao polimorfismo *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val*, as doentes com o alelo *Val* em heterozigotia ou homozigotia apresentaram um risco 2,97 vezes maior de toxicidade (OR=2,97; 95% IC=1,03-8,58).

Não houve diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros genótipos.

**Tabela XXII - Variação da toxicidade hematológica ( $\geq$  Grau 2, pelos critérios da ECOG) em mulheres que fizeram quimioterapia com os polimorfismos genéticos.**

<i>Genótipos</i>	<b>Com toxicidade</b>		<b>Sem toxicidade</b>		<b>OR (95%IC)</b>
<i>GSTM1</i>					
<i>nulo</i>	20	(13,2%)	58	(38,4%)	0,85 (0,42-1,75)
<i>presente</i>	21	(13,9%)	52	(34,4%)	
<i>GSTT1</i>					
<i>nulo</i>	9	(6,0%)	27	(18,0%)	0,85 (0,36-2,01)
<i>presente</i>	32	(21,3%)	82	(54,6%)	
<i>GSTPIAla<sup>114</sup> Val</i>					
<i>Ala/Ala</i>	31	(22,3%)	92	(66,1%)	<b>2,97 (1,03-8,58)</b>
<i>Ala/Val + Val/Val</i>	8	(5,7%)	8	(5,7%)	
<i>GSTP1Ile<sup>105</sup> Val</i>					
<i>Ile/Ile</i>	19	(12,3%)	49	(31,8)	0,89 (0,43-1,82)
<i>Ile/Val + Val/Val</i>	22	(14,2%)	64	(41,5%)	

*GSTM1* e *GSTT1* *nulos* significa que são homocigotos para a deleção

A associação dos genótipos *GSTM1*\*0/0 e *GSTT1*\*0/0 não mostrou tendência para aumentar o risco de toxicidade hematológica (OR = 0,86; 95% IC= 0,51-1,46).

## 6 - DISCUSSÃO

---

As enzimas Glutathione S-transferases estão envolvidas no metabolismo de uma larga variedade de potenciais compostos carcinogénicos exógenos e endógenos e no metabolismo de fármacos. Torna-se biologicamente pausável que genótipos com diferentes níveis de actividade possam associar-se a uma variação da susceptibilidade para o cancro da mama, do prognóstico e da resposta à terapêutica (*Helzlsouer et al, 1998; Saxena et al, 2009*). Verificou-se que os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* estão reconhecidamente envolvidos na resposta às espécies de oxigénio reactivas e aos produtos de peroxidação lipídica, que resultam de tratamentos como a quimioterapia e a radioterapia e por isso, em alguns trabalhos, têm sido associados a uma alteração no risco de morte e recorrência a seguir a um tratamento do cancro da mama.

Grande parte dos estudos realizados sobre polimorfismos é do tipo caso-controlo, em que o risco relativo pode ser determinado pelo quociente *OR* (*odds ratio*), que representa o grau de magnitude desta associação e dá uma importante informação sobre a causalidade e a definição de risco atribuível a um determinado factor de risco.

Este estudo caso-controlo foi realizado numa população portuguesa, de raça caucasiana, maioritariamente da região Centro do País, com 275 mulheres com cancro da mama e um grupo controlo constituído por 276 mulheres sem patologia oncológica conhecida.

A distribuição da frequência genotípica e alélica no grupo controlo e no grupo de doentes em relação aos polimorfismos *GSTM1\*0/0* e *GSTT1\*0/0* não foi diferente da esperada em relação a outras populações: em relação ao genótipo *GSTM1\*0/0*, encontrou-se uma frequência de 47,8% e de 53,0%, respectivamente, sendo idêntica à descrita na literatura, que refere que 20 a 56% dos indivíduos de raça caucasiana têm falta de actividade da enzima *GSTM1* (*Pavanello et al, 2000, Krajcinovic et al, 2001; Vogl et al, 2004; Egan et al, 2004*).

Neste grupo de mulheres, a frequência genotípica de *GSTT1\*0/0* no grupo controlo e nas doentes foi de 23,1% e 25%, respectivamente. Este valor é idêntico ao referido na literatura: 14 a 49% dos indivíduos caucasianos têm deleção homozigótica

no gene *GSTT1* (Pavanello et al, 2000; Krajinovic et al, 2001; Egan et al, 2004; Steck et al, 2007).

Os polimorfismos no gene *GSTP1*, com alteração do aminoácido na posição 105 da isoleucina pela valina, ou na posição 114 com substituição da Alanina pela Valina, fazem com que estas substituições, embora com aminoácidos do mesmo grupo químico (grupo I), possa ter importância por limitar o livre acesso do substrato ao local da enzima necessário para a conjugação com a glutatona e por interferir com a sua termoestabilidade (Saxena et al, 2009).

Na literatura são referidas frequências genóticas para *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* de 50 a 66% em homozigotia para o alelo comum *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile*, 30-43% para *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e 5 a 9% em homozigotia para a variante alélica *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* (Dirven et al, 1994; Sweeney et al, 2000; Krajinovic et al, 2001; Egan et al, 2004; Steck et al, 2007). Neste estudo verificou-se que as frequências genóticas deste polimorfismo na população controlo e no grupo das doentes, foram para *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Ile* de 34,7% e 39,6%, para *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* de 45,6 e 49,0% e para *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* 17,3% e 10,5%, respectivamente, ou seja os resultados não diferem significativamente em relação ao descrito para outras populações caucasianas.

Na literatura encontram-se muito menos referências em relação ao polimorfismo do gene *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val*. Emburgh et al (2008) no seu estudo referem uma frequência genotípica num grupo controlo e num grupo de doentes com cancro da mama, em mulheres de raça caucasiana, de 84% e 87,5% para *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala*, 12,2 e 14,5% para *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Val* e 0,2 e 0,5% para *GSTP1<sup>114</sup>Val/Val*, respectivamente. Neste estudo encontrou-se uma frequência genotípica para o grupo controlo e de doentes de 73,5% e 83,2% para *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Ala*, de 4,3 e 7,2% para *GSTP1<sup>114</sup>Ala/Val* e 2,1% e 1,8% para *GSTP1<sup>114</sup>Val/Val*, respectivamente.

Os estudos são mais controversos quanto à relação entre os polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e a susceptibilidade para cancro da mama. Vogl Florian D. et al (2004) fizeram um dos maiores estudos de investigação sobre susceptibilidade para cancro da mama, relacionada com polimorfismos dos genes *GSTs*. Apresentaram dados de sete estudos caso-controlo que foram englobados no *International Collaborative Study on Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens*, englobando 2 048 casos com cancro da mama e 1 969 controlos. O estudo concluiu que os polimorfismos nos genes *GSTs* não apresentavam um papel major na susceptibilidade para cancro da mama. Os *odds ratios* (95% de IC) para cancro da mama não foram estatisticamente

significativos: para *GSTM1*\*0/0, (OR=0,98; 95% IC=0,86-1,12) para *GSTT1*\*0/0 (OR=1,11; 95% IC=0,87-1,41) ou para *GSTP1Ile*<sup>105</sup>*Val* em heterozigotia (OR=1,01; 95% IC=0,79-1,28) ou homozigotia (OR=0,93; 95% IC=0,62-1,38).

*Zhong et al (1993)* não encontraram associação dos genótipos nulos de *GSTM1* ou *GSTT1* com cancro da mama.

*Helzlsouer et al (1998)*, referem um aumento de susceptibilidade para cancro da mama associado ao genótipo *GSTM1*\*0/0 (OR=2,10; 95% IC=1,22-3,64) e ao alelo *Val* em *GSTP1Ile*<sup>105</sup>*Val* (OR=1,97; 95% IC=0,77-5,02). Em relação ao genótipo *GSTT1*\*0/0 verificaram aumento de risco, mas sem significado estatístico (OR=1,50; 95% IC=0,76-2,95).

*Saxena et al (2009)* num estudo numa população do Norte da Índia com 413 doentes com cancro da mama e 410 controlos verificaram que havia um aumento de risco para cancro da mama associado ao genótipo *GSTM1*\*0/0 (OR = 2,28; 95% IC = 1,65-2,97) e à homozigotia para o alelo *Val* no gene *GSTP1Ile*<sup>105</sup>*Val* (OR=2,59; 95% IC=1,67-4,39). Neste estudo não se encontrou associação entre o genótipo *GSTT1*\*0/0 e o risco global para cancro da mama (OR=1,04; 95% IC = 0,76-1,59).

No nosso estudo tipo caso-controlo verificou-se que o genótipo *GSTM1*\*0/0 esteve associado a um risco de cancro da mama de 1,24 vezes, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (OR = 1,24; 95% IC = 0,88-1,74). O genótipo *GSTT1*\*0/0 associou-se a um aumento de risco para cancro da mama de 1,12 vezes, mas também sem significado estatístico (OR=1,12; 95% IC = 0,75-1,65).

Em relação ao polimorfismo *GSTP1Ala*<sup>114</sup>*Val*, os genótipos *GSTP1*<sup>114</sup>*Ala/Val* e *GSTP1*<sup>114</sup>*Val/Val* surgiram associados a um aumento de risco de 1,22 vezes para cancro da mama, contudo esta diferença não teve significado estatístico (OR = 1,22; 95% IC = 0,65-2,30).

Em relação ao polimorfismo de *GSTP1Ile*<sup>105</sup>*Val*, o genótipo *GSTP1*<sup>105</sup>*Val/Val* associou-se a uma menor susceptibilidade para cancro da mama, quando comparado com os genótipos *GSTP1*<sup>105</sup>*Ile/Val* e *GSTP1*<sup>105</sup>*Ile/Ile* (OR = 0,55; 95% IC = 0,33-0,90). Inversamente, a presença de pelo menos um alelo *Ile* (em homozigotia ou heterozigotia) associa-se a um aumento do risco para cancro da mama de 1,82 vezes em relação às mulheres com genótipo *GSTP1*<sup>105</sup>*Val/Val* (OR=1,82; 95% IC = 1,11-2,99; *p*<0,02). Confirmando os dados anteriores, a comparação das distribuições alélicas do polimorfismo *GSTP1Ile*<sup>105</sup>*Val* entre as doentes e os controlos revelou um aumento da

frequência do alelo *Ile* na população com cancro da mama (64,6% vs 58,8%) com OR=1,28 (95% IC =1,00-1,63;  $p=0,05$ ).

Alguns trabalhos publicados mostraram uma maior influência dos polimorfismos no risco de cancro da mama nas mulheres pós-menopáusicas, nomeadamente quando apresentavam o genótipo *GSTM1\*0/0* e *GSTT1\*0/0* (Helzlsouer et al, 1998; Amorim et al, 2002). Ambrosone et al (1995), num estudo caso-controlo com um grupo de 216 doentes com cancro da mama e 282 controlos de uma população pós-menopáusica, verificaram que não houve aumento de risco associado ao genótipo *GSTM1\*0/0* (OR=1,10; 95% IC = 0,73-1,64). Só se registou um aumento de risco para cancro da mama com o genótipo *GSTM1\*0/0* nas mulheres com menos de 58 anos na altura do diagnóstico, mas este aumento não teve significado estatístico (OR=2,44, 95% IC=0,89-6,64).

Dunning et al (1999) verificaram que havia uma associação entre os polimorfismos e o risco de cancro da mama se as doentes apresentassem o genótipo *GSTM1\*0/0* na pós-menopausa (OR=1,33; 95% IC=1,01-1,76) e o alelo *Val* no polimorfismo *GSTP1Ile<sup>105</sup>Val* (OR=1,60; 95% IC = 1,08-2,39). Não houve associação com o genótipo *GSTT1\*0/0*.

No nosso estudo verificou-se que nas mulheres pós-menopáusicas o genótipo *GSTM1\*0/0* esteve associado a um aumento de risco para cancro da mama de 1,34 vezes, com valores próximos da significância estatística (OR=1,34; 95% IC= 0,90-2,00). Esta associação não se verificou nas mulheres pré-menopáusicas (OR= 0,76; 95% IC= 0,38-1,55). Em relação ao genótipo *GSTT1\*0/0*, verificou-se que havia um aumento de risco para cancro da mama de 1,44 vezes nas mulheres pré-menopáusicas e 1,26 vezes na pós-menopausa, mas sem significado estatístico (OR = 1,44; 95% IC = 0,59-3,53 e OR = 1,26; 95% IC = 0,79-2,02, respectivamente).

O estudo sobre a associação de diferentes polimorfismos e o risco para cancro da mama também não é conclusivo nos diversos trabalhos publicados. Saxena et al (2009) concluíram que a combinação de genótipos considerados “de risco” - *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* e os genótipos *GSTM1\*0/0* e *GSTT1\*0/0* - resultou num aumento de risco para cancro da mama em quatro vezes (OR = 4,02; 95% IC = 1,99-8,51). Helzlsouer et al (1998) no seu estudo encontraram um aumento de risco para cancro da mama de 3,77 vezes com a associação dos genótipos *GSTM1\*0/0*, *GSTT1\*0/0* e *GSTP1<sup>105</sup>Ile/Val* e *GSTP1<sup>105</sup>Val/Val* (OR=3,77; 95% IC = 1,10-12,88).

Na nossa população a associação de diferentes polimorfismos não aumentou o risco para cancro da mama de forma significativa do ponto de vista estatístico. Apenas quando se associaram os genótipos *GSTM1*\*0/0 e *GSTT1*\*0/0 se verificou um aumento de risco para cancro da mama de 1,17 vezes (OR=1,17, 95% IC=0,91-1,49), próximo do significado estatístico.

Após pesquisa bibliográfica verificou-se que são muito escassos os estudos publicado sobre a relação entre os polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com os diversos factores de prognóstico do cancro da mama. Há três trabalhos que relacionaram estes polimorfismos com mutações no gene *TP53*: *Nedelcheva et al* (1998), *Gudmundsdottir et al* (2001) e *Emburgh et al* (2007) concluíram que as doentes com alelo *Val* em *GSTP1*Ile<sup>105</sup>*Val* tinham mais mutações no gene *TP53*, que doentes com genótipo *Ile/Ile* (p=0,055). *Nedelcheva et al* (1998) verificaram também que as mulheres com o alelo *Val* tinham mais gânglios negativos (p=0,0004) e que os gânglios positivos eram mais frequentes nas doentes que tinham os genótipos *GSTM1*\*0/0 e *GSTT1*\*0/0 (p=0,05). *Emburgh et al* (2007) não verificaram qualquer relação com o genótipo *GSTM1*\*0/0. *Gudmundsdottir et al* (2001) concluíram igualmente que as doentes com cancro da mama apresentaram mais mutações no gene *TP53*, quando tinham o genótipo *GSTT1*\*0/0 (p=0,019).

A detecção intra-celular da proteína *TP53* por imuno-histoquímica correlaciona-se com a presença de mutações no gene *TP53*. Há diversos trabalhos sobre o gene *TP53* e outros cancros (pulmão, doenças hematológicas), que associam a mutação deste gene com polimorfismos genéticos em enzimas de metabolismo.

Neste contexto, seria interessante avaliar a eventual interferência dos polimorfismos com o estadiamento e com algumas características biológicas, consideradas factores de prognóstico para a doença, nomeadamente a invasão ganglionar, o grau de diferenciação do tumor, receptores hormonais, sobreexpressão do HERBB2, Ki67, p53 e invasão linfo-vascular.

Ao comparar os estadios menos graves 0/I e II com os estadios III/IV para os diferentes genótipos, verificou-se que não havia diferença estatisticamente significativa, embora se tenha registado uma tendência para a associação do genótipo *GSTM1*\*0/0 com estadios mais avançados (OR=1,23; 95% IC=0,62-2,42).

No nosso estudo, o genótipo *GSTM1*\*0/0 foi o que apresentou maior interferência com os parâmetros avaliados: maior tendência para se associar a gânglios axilares positivos (OR=1,49; 95% IC=0,89-2,50), receptores de progesterona negativos

(OR=1,24; 95% IC=0,72-2,13); aumento de 3 vezes no risco dos tumores serem TP53 positivos (OR=3,00; 95% IC=1,24-7,25;  $p=0,02$ ) e um aumento de risco de 3,17 vezes dos tumores serem Ki67 positivos (OR=3,17; 95% IC=1,06-9,52;  $p<0,04$ ). Este genótipo apresentou ainda um risco maior dos tumores serem ERBB2 positivos, embora sem significado estatístico (OR=1,48; 95% IC=0,78-2,81). Em relação ao polimorfismo de *GSTP1* Ile<sup>105</sup> Val, em heterozigotia ou homozigotia com o alelo Val, verificou-se um aumento de 1,54 vezes de sobreexpressão de ERBB2 (OR=1,54; 95% IC=0,80-2,97) e um aumento de 1,53 vezes de invasão linfo-vascular (OR=1,53; 95% IC=0,80-2,92).

Quer a radioterapia quer a quimioterapia exercem o seu efeito antineoplásico gerando ROS (*reactive oxygen species*). Em muitos casos, estas substâncias causam morte celular, e a quantidade de espécies reactivas que atingem o tumor e que têm efeito citotóxico directo ou que interferem com as vias intracelulares de apoptose, têm provavelmente um impacto inicial e imediato na eficácia do tratamento. Assim, a variabilidade inter-individual nas enzimas que irão afectar os níveis dos ROS terá provavelmente influencia o prognóstico após tratamento (Ambrosone et al, 2001). A falta de actividade destas enzimas faz com que esteja reduzida a remoção dos produtos orgânicos secundários da oxidação produzidos pela terapêutica instituída para o cancro da mama e portanto, melhor resposta à terapêutica, mas eventualmente mais efeitos na toxicidade (Ambrosone et al, 2001).

A pesquisa sobre artigos publicados sobre esta matéria não permitiu encontrar nenhum trabalho com os citostáticos mais usados no tratamento do cancro da mama. Apenas foram encontradas algumas referências sobre o efeito dos polimorfismos na eficácia terapêutica ou na toxicidade com poucos fármacos e a maioria não é usada no tratamento desta doença.

Este estudo teve também como objectivo avaliar se havia diferenças no risco de toxicidade hematológica em relação aos diferentes polimorfismos genéticos de *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTP1*. Foi avaliado este tipo de toxicidade por ser dos mais frequentes e dos mais graves.

Os dados confirmam que poderá haver interferência dos polimorfismos genéticos na toxicidade e no resultado do tratamento com quimioterapia. Nas doentes com cancro da mama que fizeram quimioterapia, verificou-se que as mulheres com o alelo Val em heterozigotia ou homozigotia no gene *GSTP1* Ala<sup>114</sup> Val apresentaram um risco 2,97 vezes maior de toxicidade (OR=2,97; 95% IC=1,03-8,58).

Não houve diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros genótipos.

De uma forma geral, podemos concluir que a presença dos genótipos *GSTM1\*0/0* e *GSTT1\*0/0* se associaram a uma tendência para aumento de susceptibilidade para cancro da mama (OR=1,24; 95% IC = 0,88-1,74 e OR=1,12; 95% IC = 0,75-1,65, respectivamente). O genótipo *GSTM1\*0/0* apareceu mais associado com tumores TP53 positivos, Ki67 positivos, receptores de progesterona negativos, gânglios positivos e sobreexpressão de ERBB2.

O alelo *Val* em homozigotia ou heterozigotia de *GSTP1Ala<sup>114</sup>Val* esteve mais relacionado com toxicidade hematológica.

Os valores do *odds ratio* com significado estatístico foram baixos (variaram entre 1,28 e 3,17), o que está de acordo com os valores descritos na literatura para polimorfismos associados a outras doenças complexas, como outras neoplasias, diabetes ou doenças cardio-vasculares.

## 7 - Perspectivas Futuras

---

Alguns polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* podem ser marcadores de susceptibilidade, de prognóstico ou de toxicidade no cancro da mama.

Estes resultados são preliminares e no futuro decerto surgirão novos trabalhos que poderão ser mais conclusivos, nomeadamente se assentarem em amostras mais extensas e com outras populações. Poderá ter interesse desenvolver estudos prospectivos para avaliação da resposta à quimioterapia, à toxicidade, e marcadores de prognóstico (com estudo da sobrevivência).

Vários autores têm associado a sobreexpressão de algumas GSTs, em particular da GST $\pi$  à resistência natural e adquirida a várias drogas citostáticas, como os agentes alquilantes. De facto, verifica-se que há uma sobreexpressão destas enzimas em tumores, quando comparados com tecidos normais, e um nível plasmático mais elevado em doentes com cancro pelo que, as GSTs são consideradas marcadores de cancro. Este princípio constitui o enquadramento para a pesquisa de inibidores das GSTs e de pró-drogas citotóxicas activadas pelas GSTs.

A primeira geração de inibidores das GSTs incluiu o ácido etacrínico que mostrou uma acção potente *in vitro*, mas a perda de especificidade de isoenzimas e os seus efeitos colaterais como diurético, fez com que não fosse usado na clínica (Gaté *et al*, 2001). Surgiram então novos inibidores das GSTs incluindo análogos da glutathione, que mostraram mais especificidade e menor toxicidade. Mais recentemente foi produzido o *TER 199* que inibe especificamente a GST $\pi$  e o *TER 286*. Também, recentemente, têm sido investigados os mecanismos moleculares envolvidos na resposta celular aos inibidores das GSTs e usado técnicas para examinar a expressão genética e identificar os novos genes induzidos por estes agentes (Tew *et al*, 1997).

No futuro poderá ser feita a determinação dos polimorfismos do gene *GSTP1* para cada doente e estes poderão funcionar como marcadores para a utilização dos inibidores específicos que estão a ser desenvolvidos.

A utilização de *microarrays* irá dar um forte contributo na determinação de centenas ou milhares de SNPs em estudos de associação, definindo alelos de risco e do perfil de polimorfismos, o que ajudará a fazer uma avaliação do risco e do prognóstico e a definir estratégias de prevenção e terapêutica de várias doenças, como o cancro da mama.

## 8 - BIBLIOGRAFIA

---

Abdel-Rahaman S Z, El-Zein R A, Anwar W A, Au W W. *A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies.* Cancer Letters. 1996. 107: 229-233.

Ambrosone, C.B., Freudenheim JL, Graham S.M. et al. *Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase (M1) polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk.* Cancer Res. 1995. 55:3483-3485.

Ambrosone CB, Coles BF, Freudenheim JL, Shields PG. *Glutathione S-transferase (GSTM1) genetic polymorphisms do not affect human breast cancer risk, regardless of dietary antioxidants.* J Nutr. 1999. 129 (2S Suppl): 565S-568S.

Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, et al. *Polymorphisms in Glutathione S-Transferase (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer.* Cancer Research. 2001. 61: 7130-7135.

Ambrosone C.A, Tian C., Ahn J, et al. *Genetic predictors of acute toxicities related to radiation therapy following lumpectomy for breast cancer: a case-series study.* Breast Cancer Research. 2006.Vol.8. N° 4: 1-7.

Amorim, L.M.F., Rossini A., Mendonça, G.A.S., PF Lotsch, et al. *CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 Polymorphisms and Breast Cancer risk in Brazilian Women.* Cancer Letters, 2002. 181 :179-186.

Ates N.A., Tursen U., Kanik T.A., et al. *Glutathione S-transferase polymorphisms in patients with drug eruption.* Arch Dermatol Res. 2004. 295: 429-433..

Bailey, L.R., Roodi, N. Verrier, CS et al. *Breast cancer and CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms:evidence of a lack of association in caucasians and african americans.* Cancer Res. 1998. 58: 65-70.

Botstein D., Risch N. *Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease*. Nature Genetics Supplement. 2003. 33: 228-237.

Burg D., Riepsaame J., Pont C., et al. *Peptide-bond modified conjugate analogs modulate GST $\pi$  function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling*. Biochemical Pharmacology. 2006.71: 268-277.

Burmeister M. *Basic concepts in the study of diseases with complex genetics*. Biological Psychiatry. 1999. 45: 522-532.

Chacko, T. Joseph, B.S. Mathew, B. Rajan and M. R. Pillai. *Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2005. March, 581 : 153-163.

Charrier J, Maugard CM, Le Mevel B, Bignon YJ. *Allelotype influence at glutathione S-transferase M1 locus on breast cancer susceptibility*. Br J Cancer. 1999. 79: 346-353.

Crofts F, Taioli E, Trachman J, et al. *Functional significance of different human CYP1A1 genotypes*. Carcinogenesis. 1994. Vol 15, n° 12: 2961-2963.

Curran JE, Weinstein SR, Griffiths LR. *Polymorphisms of Glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility*. Cancer Lett. 2000. 153 : 113-120.

Dirven H.A., Van Ommen B and Bladeren PJ. *Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione*. Cancer Res. 1994. 54: 6215-6220.

Fontana X, Peyrottes I, Rossi C, Leblanc-Talent P et al. *Study of the frequencies of CYP1A1 gene polymorphisms and Glutathione S-transferase mu 1 gene in primary breast cancers: an update with an additional 114 cases*. Mutation Research. 1998. 403 : 45-53.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Pondet BA, Easton DF. *A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999. 8:843-854.

Easton, F.D., Pooley, K.A., Dunning, A.M., et al. *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.* Nature. 2007 Jun (447). 1087-1093.

Edvardsen H.M.Sc., Kristensen V.N., Alnaes G.I.G., et al. *Germline glutathione S-transferase variants in breast cancer: relation to diagnosis and cutaneous long-term adverse effects after two fractionation patterns of radiotherapy.* Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2007. 67 : 4. 1163-1171.

Egan KM, Cai Q, Shu XO, Jin F, et al. *Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1 and GSTT1 and the risk for breast cancer: results from the Shanghai breast cancer study and metaanalysis.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004. 13: 197-204.

Feuk L., Marshall C. R., Wintle R.F.& Scherer S.W. *Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies.* Human Molecular Genetics. 2006. 15: R57-R66.

Garcia-Closas M, Kelsey KT, Hsunkinson SE, et al. *Glutathione S-transferase mu and theta polymorphisms and breast cancer susceptibility.* J Natl Cancer Inst. 1999. 91 : 1960-1964.

Gold B, Kalush F, Bergeron J, Scott K et al. *Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk.* Cancer Res. 2004.64: 8891-900.

Gudmundsdottir, K., Tryggvadottir, L. and Eyfjord, J.E. *GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene.* Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 2001; 10: 1169-1173.

Harries, L.W., Stubbins, M. J., Forman, D., et al. *Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase  $\pi$  locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer.* Carcinogenesis (Lond.); 1997. 18: 641-644.

Hashibe M, Brennan P, Strange R C, et al. *Meta and Pooled Analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 Genotypes and Risk of Head and Neck Cancer.* Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Dec. 2003.Vol 12: 1509-1517.

Heagerty A H M, Fitzgerald D, Smith A, et al. *Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumors.* Lancet. Jan 1994. 29. 343:266-68.

Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY et al. *Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer.* J Natl Cancer Inst. 1998. 90: 512-8.

Houlston RS, Tomlinson IP. *Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead.* Med Genet. 2000. 37: 161-167.

Innocenti F, Ratain M J. *Update on Pharmacogenetics in cancer chemotherapy.* European Journal of Cancer. 2002. 38: 639-644.

International Human Genome Sequencing Consortium. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome.* Nature. 2004. 431: 931-945.

Kelsey, K T, Hankinson, S E, Colditz, G A, Springer, K, et al. *Glutathione S-transferase class  $\mu$  deletion polymorphism and breast cancer: results from prevalent versus incident cases.* Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 1997. 6: 511-515.

Knudsen LE, Loft SH, Autrup H. *Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man.* Mutat Res. 2001. 482:83-8.

Krajinovic M, Ghadirian P, Richer C, et al. *Genetic susceptibility to breast cancer in french-canadians: role of carcinogen-metabolizing enzymes and gene-environment interactions*. Int j Cancer. 2001. 92:220-225.

Kruglyak L., Nickerson, D.A. *Variation is the spice of life*. Nature Genetics. 2001. 27: 234-236.

Kuptsova N., Chang-Claude J, Kropp S., et al. *Genetic predictors of long-term toxicities after radiation therapy for breast cancer*. Int J. Cancer; 2008. 122: 1333-1339.

Ladona M G, Abildúa R E, Ladero J M, et al. *CYP2D6 genotypes in Spanish women with breast cancer*. Cancer Letters; 1996. 99: 23-28.

Lecomte T., Landi B., Beaune P., et al. *Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy*. Clin Cancer Res. May 2006.12.: 3050-3056.

Mani M., Kandavelou K., Chandrasegaran S. *Restriction enzymes*. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. 2005.

Marie-Genica Consortium on Genetic Susceptibility for Menopausal Hormone Therapy Related Breast Cancer Risk. *Genetic polymorphisms in phase I and phase II enzymes and breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy in postmenopausal women*. Breast Cancer Res. Treat. 2009. (doi:10.1007/s10549-009-0407-0).

Matheson, M.C., Stevenson, T., Akbarzadeh, S. and Propert, D.N. *GSTT1 null genotype increases risk of premenopausal breast cancer*. Cancer Lett. 2002. 181: 73-79.

Maugard CM, Charrier J, Bignon YJ. *Allelic deletion at glutathione S-transferase M1 locus and its association with breast cancer susceptibility*. Chem Biol Interact. 1998. 111-112: 365-375.

Maugard, C.M., Charrier, J., Pitard, A, et al. *Genetic polymorphism at the glutathione S-transferase (GST)P1 locus is a breast cancer risk modifier*. Int. J. Cancer 2001. 91: 334-339.

McCarty K.M., Santella R.M., Steck S.E., et al. *PAH-DNA adducts, cigarette smoking, GST polymorphisms, and breast cancer risk*. Environmental Health Perspectives. April 2009.117 : 4. 552-558.

Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, et al. *Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer*. Angiogenesis, 2004. 7: 53-58.

Meyer U.A. *Pharmacogenetics and adverse drug reactions*. The Lancet. Nov.11. 2000. 356; 1667-1671.

Milikan R, Pittman G, Tse CK, Savitz DA, Newman B, Bell D. *Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 and breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000. 9: 567-73.

Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, et al. *Glutathione S-transferase M1, M3, P1 and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001. 10: 229-236.

Mitrunen, K., Hirvonen, A. *Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism*. Mutation Research. 2003. 544 : 9-41.

Moscow J A, Townsend A J, Goldsmith M E , et al. *Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer*. Proc Natl. Acad Sci USA. Sept, 1988. 85/17: 6518-6522.

*Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 7 March 2005. Vol 581, Issues 1-2 : 153-163.

Nedelcheva K, V Andersen, TI, Erikstein B, et al. *Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients.* Pharmacogenetics. 1998. 8: 441-447.

Pandya U, SK Srivastava, SS Singhal et al. *Activity of allelic variants of Pi Class Human Glutathione S-Transferase toward Chlorambucil.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000. 278: 258-262.

Park SK, Yoo KY, Lee SJ, et al. *Alcohol consumption, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk.* Pharmacogenetics. 2000. 10: 301-309.

Pavanello S, Clonfero E. *Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms.* Mutation Research, 2000. 463: 285-308.

Regateiro F. J., Silva H.C., Lemos M.C.. *Genética e Cancro Ginecológico e da Mama.* 2002. Vol II.

Risch N, Merikangas K. *The future of genetic studies of complex human diseases.* Science. 1996. 273: 1516-1517.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Santella R.M. *Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification.* Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention. 2006. 15 : 9. 1585-1587.

Saxena, A., Dhillon, V.S., Raish, M., et al. *Detection and relevance of germline genetic polymorphisms in glutathione S-transferase (GSTs) in breast cancer patients from northern Indian population.* Breast Cancer Res Treat. 2009. 115: 537-543.

Schmid F.X. *Biological Macromolecules: UV-visible spectrophotometry*. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. 2001.

Siegelmann-Danieli N, Buetow KH. *Significance of genetic variation at the Glutathione S-transferase M1 and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 detoxification genes in breast cancer development*. *Oncology*. 2002. 62: 39-45.

Spurdle, A.B., Chang, J.H., Byrnes, G.B., et al. *A systematic approach to analysing gene-gene interactions: polymorphisms at the microsomal epoxide hydrolase EPHX and glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci and breast cancer risk*. *Cancer Epidemiol. Biomark.* 2007. 16 (4) : 769-774.

Srivastava, S.K., Singhal, S.S., Xun Hu, et al. *Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa*. *Arch. of Bioch. and Biophysics*. June 1, 1999. 366 : 89-94.

Stefano Landi. *Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review*. *Mutation Research*. 2000. 463 : 247-283.

Strange R C, Spiteri M A, Ramachandran S, Fryer A A. *Glutathione-S-transferase family of enzymes*. *Mutation Research*. 2001.482: 21-26.

Sweeney C, McClure GY, Fares MY, Stone A, et al. *Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105 Val polymorphism*. *Cancer Research*. 2000. 60: 5621-5624.

Syamala VS, Sreeja L., Syamala V, Raveendran PB, et al. *Influence of germline polymorphisms of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 in familial versus sporadic breast cancer susceptibility and survival*. *Fam Cancer*. 2007. 10.1007/s10689-007-9177-1.

Tabor H.K., Risch N.J., Myers R.M. *Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations*. *Nature Reviews Genetics*. 2002. 3: 391-396.

Tan D.S., Marchiò C., Reis-Filho J.S.. *Hereditary breast cancer:from molecular pathology to tailored therapies*. J. Clin. Pathol. Oct, 2008. 61(10): 1073-1082.

The Breast Cancer Association Consortium. *Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium*. Journal of the National Cancer Institute. Oct 4, 2006. 98 : 19.

Townsend D.M., Tew K.D. *The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance*. Oncogene. 2003. 22: 7369-7375.

Tsai-Wang Chang, Shuei-Ming Wang, Yue-Liang L. Guo, et al. *Glutathione S-transferase polymorphisms associated with risk of breast cancer in southern Taiwan*. The Breast. 2006. 15: 754-761.

Vogl F.D., Taioli E., Maugard C., et al. *Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 and Breast cancer: A pooled analysis*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2004. 13 (9):1473-1479.

Yang G, Shu XO, Ruan ZX, Cai QY, et al. *Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma*. Cancer. 2005.103:52-58.

Winter P.C. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. 2005.

White B.A. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Design and optimization of reactions*. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. 2005.

Wrensch M, Kelsey K T, Liu M et al. *Glutathione-S-transferase Variants and Adult Glioma*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. March 2004. 13(3).

Wu FY, Lee YJ, Chen DR, Kuo HW. *Association of DNA-protein crosslinks and breast cancer*. Mutat Res. 2002. 501: 69-78.

Van Emburgh, B.O., Hu, J.J., Levine, E.A., et al. *Polymorphisms in CYP1B1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1, and susceptibility to breast cancer*. *Onc. Reports*. 2008.19: 1311-1321.

Videira A. *Engenharia Genética: princípios e aplicações*. Lidel - edições técnicas, lda. 2001.

Zhao, M., Lewis, R., Gustafson, D.R., Wen, W.Q., et al. *No apparent association of GSTP1 A (313)G polymorphism with breast cancer risk among postmenopausal Iowa women*. *Cancer Epidemiol. Biomarker. Prev.* 2001. 10: 1301-1302.

Zhao G., Yu T., Wang R., et al. *Synthesis and structure-activity relationship of ethacrynic acid analogues on glutathione-S-transferase P1-1 activity inhibition*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005. 13. 4056-4062.

Zheng W, Wen WQ, Gustafson DR, Gross M, Cerhan JR, Folsom AR. *GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk*. *Breast Cancer Res Treat.* 2002. 74: 9-16.

Ziminiak, P., Nanduri, B., Pikula,S, Bandorowicz-Pikula, J., et al. *Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties*. *European Journal of Bioch.* 1994. 224: 893-899.

Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. *Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer*. *Carcinogenesis*. 1993. 14:1821-1824.

## 9- APÊNDICE

---

### Abreviaturas utilizadas e palavras que não existem na língua portuguesa

Algumas palavras e expressões que não existem na língua portuguesa foram utilizadas uma vez que são de difícil tradução, de uso comum na linguagem científica corrente e empregues com o mesmo sentido na língua anglo-saxónica.

As unidades de medida foram baseadas no Sistema Internacional de Unidades.

$\phi$ X174/HaeIII - plasmídeo  $\phi$ X174 digerido com a enzima de restrição nº3 com origem na *Haemophilus aegyptius*

X<sup>2</sup> - Qui-quadrado

$\mu$ l - microlitro

$\mu$ M - micromolar

\* colocado após o símbolo do gene, representa um alelo

3' - extremidade hidroxilo livre da cadeia de DNA

5' - extremidade fosfato livre da cadeia de DNA

A - adenina

AclI - enzima de restrição

APS - persulfato de amónio

C - citosina

cDNA - DNA complementar, obtido através do RNA por transcrição reversa

CYP1A1 - cytochrome P450, subfamily IA, polypeptide 1 (gene do citocromo P450 1A1)

CYP2D6 - cytochrome P450, subfamily IID, polypeptide 6 (enzima citocromo P450 2D6)

cm - centímetro

dATP - desoxiadenosina 5' trifosfato

dCTP - desoxicitidina 5' trifosfato

dTTP - desoxitimidina 5' trifosfato

dl - decilitro

DMSO - dimetilsufóxido

DNA - deoxyribonucleic acid (o mesmo que DNA, ácido desoxirribonucleico)

dNTPs - deoxynucleotide triphosphates (desoxirribonucleósidos 5' trifosfato)

dp - desvio padrão

DTT - ditioneitol

EUA - Estados Unidos da América

EDTA - etilenodiaminotetracetic acid (ácido etilenodiaminotetraacético)

EX - exão

fig. - figura

G - guanina

gr - grama

GSTM1 - glutathione S-transferase, mu-1 (enzima glutathiona S-transferase M1)

GSTM1 “nulo”- genótipo caracterizado pela inativação de ambos os alelos do gene  
GSTM1

GSTP1 - glutathione S-transferase, pi-1 (enzima glutathione S-transferase P1)

GSTT1 - glutathione S-transferase, theta-1 (enzima glutathione S-transferase T1)

GSTT1 “nulo”- genótipo caracterizado pela inativação de ambos os alelos do gene  
GSTT1

h - hora

HET - heterozigóticos

IC - intervalo de confiança de 95%

IL8 - interleucina 8 (gene da interleucina 8)

INT - intrão

Kb - Kilobases

kd - Kilodalton

Locus - determinado local de um cromossoma em que se encontra um gene

Loci - plural de locus

LOH - perda de heterozigotia

M - molar

mg - miligrama

min - minuto

mL - mililitro

mM - milimolar

ng - nanograma

nm - nanometro

°C - graus centígrados

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada) (4-metilnitrosamina) - 1 (3-piridil butanona)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

OR - odds ratio (termo estatístico que traduz o risco conferido por uma determinada condição, calculado por estudos retrospectivos; >1, risco aumentado; <1, risco diminuído; =1, risco igual)

p - primer, probabilidade de um erro estatístico do tipo 1; braço curto de um cromossoma

PAH - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

pb - pares de bases

PBS - tampão fosfato salino

PCR - polymerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia)

Primer - oligodesoxirribonucleótido utilizado em reacções de PCR para iniciar a polimerização.

q - braço longo de um cromossoma

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm - rotações por minuto

s - segundo

SDS - dodecil sulfato de sódio

SNPs - single nucleotide polymorphisms

Splicing - processamento do RNA mensageiro, por remoção de sequências intrônicas

T - timina

Taq DNA polymerase - polimerase termoresistente do DNA com origem na *Thermus aquaticus*

TAE - tampão tris acetato

TBE - tampão tris borato-EDTA

TE - tampão tris-HCL e etileno-diamina

TEMED - N,N,N',N' - tetrametil etileno-diamina

TLE - tampão de lise dos eritrócitos

TLN - tampão lise de núcleos

U - unidade

U.V. - ultravioleta

## 10 - ANEXOS

---

I - Estadiamento da OMS

II - Critérios de toxicidade hematológica da ECOG

