



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Stéphanie Piacenti dos Santos

**MARCADORES MOLECULARES GST E CYP
RELACIONADOS COM FATORES CLÍNICOS EM
CÂNCER DE MAMA**

São José do Rio Preto

2016

Stéphanie Piacenti dos Santos

Marcadores Moleculares GST e CYP

**Relacionados com Fatores Clínicos em Câncer de
Mama**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eny Maria Goloni Bertollo

**Co-Orientadora: Profa^a Dr^a Érika Cristina
Pavarino**

São José do Rio Preto

2016

Piacenti-dos Santos, Stéphanie

Marcadores moleculares GST e CYP relacionados com fatores clínicos em câncer de mama

Stéphanie Piacenti dos Santos.

São José do Rio Preto, 2016.

76 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profª Drª Eny Maria Goloni Bertollo

1. Neoplasias da Mama;
2. Polimorfismo Genético;
3. Xenobióticos;
4. Fatores de Risco.

STÉPHANIE PIACENTI DOS SANTOS

**Marcadores Moleculares GST e CYP
Relacionados com Fatores Clínicos em Câncer de
Mama**

BANCA EXAMINADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE TÍTULO
DE MESTRE**

Presidente e Orientadora

Prof^a Dr^a Eny Maria Goloni Bertollo

Examinadores

1^o Prof^a Dr^a Patrícia Matos Biselli

2^o Prof^a Dr^a Michele Lima Gregório

Suplentes

1^o Prof^a Dr^a Anelise Russo

2^o Prof^a Dr^a Edenir Inez Palmero

São José do Rio Preto, 08 de Novembro de 2016

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iii
Epígrafe.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	01
1.1 Objetivos.....	09
2. Artigos Científicos.....	10
Artigo I. <i>Evaluation of molecular markers GSTM1 and GSTT1 and clinical factors in breast cancer</i>	12
Artigo II. Avaliação de genes CYPs em pacientes com câncer de mama.....	33
3. Conclusões.....	62
4. Referências Bibliográficas.....	64
5. Apêndices.....	74

Dedicatória

A minha Mãe Ana Júlia

Por todos os ensinamentos. Por todo Amor dedicado por estar sempre ao meu lado me apoiando em todas as decisões. Por não medir esforços para que tudo de certo na minha vida. Te amo muito mãezinha.

A Tia Mariangela (em nossos corações) e

Tia Rose e Tio Lino

Por toda a ajuda para que eu concretizasse tudo que almejei desde sempre na minha vida. Por ser a base sólida de uma família de amor, carinho e Luz. Por todos os exemplos de que lutar com o conhecimento e felicidade é a melhor maneira de alcançar meus objetivos.

Muito obrigada. Amo vocês.

A minha Vovó Maria

Querida vó que dedicou todos os cuidados e educação desde a infância.

Aos meus primos Lucas, Nicole

Em especial a prima Aline

Por todo o amor, incentivo, críticas, por toda a psicologia, por toda a oração, por ser você na minha vida. Te amo por toda a eternidade.

Aos meus amigos

**Anelise, Jaqueline, Jamyle, Ana Paula, Fernando, Priscilla, Sidnei, Cibele,
Fernanda, Thais, Maressa, Maicon...**

Por todo o amor, apoio e compreensão.

Agradecimentos

A Deus

Sem ele nada disso seria possível. Agradeço por tudo que ele tem proporcionado durante toda a minha vida, começando pelo grande presente que é minha família, por me permitir ter amigos tão maravilhosos e ter saúde para desfrutar de todas as oportunidades e sonhos realizados.

À minha mãe, família e amigos

Por todo amor e compreensão dedicados. Muito obrigada pelo apoio em todos os momentos.

À Prof.^a Dr.^a Eny Maria Goloni Bertollo, minha orientadora

Pela confiança e pela oportunidade de poder fazer parte de sua equipe e aprender muito com isso, tanto profissional e intelectualmente como pessoalmente. E, muito obrigada pela paciência e pelo carinho.

À Prof.^a Dr.^a Érika Cristina Pavarino

Pela co-orientação, pela oportunidade, confiança, apoio e conhecimentos. E principalmente pela grande ajuda na parte prática do trabalho.

À Dr.^a Anelise Russo

Por tudo. Pela grande colaboração em todos os sentidos, tanto na teoria quanto na parte prática do trabalho, como também por ser essa amiga dedicada em todos os momentos. Muito obrigada.

Aos Funcionários, estagiários e pós-graduandos da UPGEM

Pela ajuda e apoio na realização desse trabalho. Em especial, as funcionárias **Patrícia Matos Biselli Chicote** pelos ensinamentos e por toda ajuda e **Daniela M. Nizato** por toda dedicação e cuidados na parte prática; a mestranda **Ana Paula D. Gimenez Martins** pela amizade, grande ajuda na estatística e parceria na coleta do grupo caso e controle; a **Sabrina S. Morissugui** por concluir bem sua iniciação científica, parte deste trabalho; a mestranda **Claudia Regina dos S. Silva** pelo companheirismo, amizade e grande ajuda em todos os momentos; a doutoranda **Ana Livia S. Galbiatti Dias** e mestranda **Glaucia Maria M. Fernandes** pela grande amizade e colaboração. Vocês foram imprescindíveis.

Aos Serviço de Ginecologia e Obstetrícia e Hemocentro do Hospital de Base/FAMERP

Pela colaboração na obtenção do grupo caso e grupo controle.

Aos Pacientes e Doadoras de sangue

Pela participação. Sem vocês nada seria possível. Muito obrigada.

Aos Membros da Banca

Profa. Dra. Patrícia Matos Biselli Chicote e Profa. Dra. Michele Lima Gregório pela análise crítica do trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

Pela credibilidade, suporte e apoio.

A CAPES

Pela bolsa de estudos.

FAMERP, FUNFARME, CNPq e FAPESP

Pelo apoio e suporte financeiro.

A todos que de forma direta ou indireta ajudaram na realização desse trabalho.

Epígrafe

“Nada é por acaso.”

Chico Xavier

Lista de Tabelas

Artigo I

Table 1. Epidemiological variables, risk factors and polymorphisms association in cases and controls.....	23
Table 2. Epidemiological variables, risk factors and polymorphisms in patients with metastasis and patients without metastasis.....	24
Table 3. Clinicopathological characteristics of breast cancer patients.....	25
Table 4. Association between polymorphisms <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> and molecular subtypes of breast carcinoma.....	26

Artigo II

Tabela 1. Classificação TNM dos tumores de mama de acordo com a UICC.....	45
Tabela 2. Análise dos modelos de herança dos polimorfismos <i>CYP1A1*2A</i> e <i>CYP1A1*2C</i> para o risco do carcinoma de mama.....	46
Tabela 3. Interação entre os polimorfismos <i>CYP1A1*2A</i> , <i>CYP1A1*2C</i> , hábitos tabagista ou etilista no risco para carcinoma de mama.....	47
Tabela 4. Associação entre os polimorfismos <i>CYP1A1*2A</i> e <i>CYP1A1*2C</i> e os fatores de risco para carcinoma de mama.....	48
Tabela 5. Associação entre os polimorfismos <i>CYP1A1*2A</i> e <i>CYP1A1*2C</i> e os parâmetros clínico e histopatológicos para o carcinoma de mama.....	49
Tabela 6. Associação entre os polimorfismos <i>CYP1A1*2A</i> e <i>CYP1A1*2C</i> e os subtipos moleculares para o carcinoma de mama.....	50

Lista de abreviaturas e símbolos

AHH – Aril- Hidrocarboneto Hidroxilase

AJCC – American Joint Committee for Cancer

A>G – Transição de Adenina para Guanina

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONEP – Conselho Nacional de Saúde

CYP – Citocromo P450

DNA – Ácido Desoxirribonuclei (*deoxyribo nucleic acid*)

ER – *Estrogen receptor*

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FAPESP – Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo

FUNFARME – Fundação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

HER2 – Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor – type 2*)

GST – Glutathione – S – Transferase

HPV – Papiloma Vírus Humano (*Human Papiloma vírus*)

HWE – *Hardy – Weinberg Equilibrium*

IC – Intervalo de Confiança (*Confidence interval*)

IMC – Índice de Massa Corpórea (*Body-Mass index*)

Ki-67 – Marcador de Proliferação

M – Metástase

MgCl² - Cloreto de Magnésio

mL – Mililitro

MspI – Enzima de Restrição

MT - Methyltransferases

N – Comprometimento de linfonodo

NAT – *N - Acetyltransferases*

OR – *Odds Ratio*

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*

PR – *Progesterone Receptor*

RP – Receptor de Progesterona

RE – Receptor de Estrogênio

SNPs – Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (Single nucleotide polymorphism)

T – Tamanho de Tumor

T>C – Transição de Timina para Citosina

TNM – Classificação patológica internacional

UICC – União Internacional Contra o Câncer (*Union for International Cancer Control*)

UPGEM – Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular

χ^2 – Qui-quadrado

Resumo

Introdução: O câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres no mundo. A etiologia desta doença é multifatorial e inclui fatores como hábitos, estilo de vida, hormonais, ambientais e genéticos. O metabolismo de xenobióticos contribui para o desenvolvimento do carcinoma mamário, e polimorfismos nos genes que codificam enzimas desta via, tais como GSTs (*GSTM1* e *GSTT1*) e CYPs (*CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*) têm sido associados ao câncer de mama. **Objetivos:** Investigar a influência dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* no risco de desenvolvimento de câncer de mama; avaliar a associação dos polimorfismos e fatores de risco (idade, fumo, álcool, características clínicas) no câncer de mama, assim como características clínicas e histopatológicas do tumor.

Casuística e Métodos: O presente estudo caso-controle incluiu 752 mulheres, 219 pacientes e 533 controles. Para análise molecular foram realizadas as técnicas de PCR-Multiplex (*GSTM1* e *GSTT1*), PCR-RFLP (*CYP1A1*2A*) e PCR em tempo real (*CYP1A1*2C*). Para a análise estatística foram utilizados os programas MINITAB 16.0 (teste de Regressão Logística Múltipla), SNPstats (testes de Modelos de Herança) e BioEstat 5.0 (teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg). **Resultados:** Mulheres com idade avançada e com o hábito etilista apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres com carcinoma mamário apresentaram frequência discretamente maior (51%) do genótipo nulo *GSTM1* em relação a mulheres sem câncer (49%), no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. O genótipo nulo de *GSTT1* também não foi associado ao câncer de mama. O polimorfismo *CYP1A1*2A* foi associado ao risco para câncer de mama e o polimorfismo *CYP1A1*2C* foi mais frequente em tumores com ausência de metástase à distância. **Conclusões:** Mulheres

com idade avançada e que ingerem bebida alcoólica apresentam risco aumentado para desenvolver câncer de mama. O polimorfismo *CYP1A1**2A está associado ao câncer de mama e o polimorfismo *CYP1A1**2C está relacionado às mulheres com ausência de metástase à distância. Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* não apresentam associação com o desenvolvimento do câncer de mama.

Palavras chave: Câncer de mama; polimorfismo genético; xenobióticos; citocromo P450; glutathiona transferase.

Abstract

Introduction: Breast cancer is a leading cause of death in women worldwide. The etiology of this disease is multifactorial, including factors such as habits and lifestyle, hormonal, environmental and genetic. The xenobiotic metabolism contribute to the development of breast carcinoma and polymorphisms in genes encoding enzymes in this pathway, such as GST (*GSTM1* and *GSTT1*) and CYPs (*CYP1A1*2A* and *CYP1A1*2C*) have been associated to breast cancer. **Objectives:** To investigate the influence of the *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1*2A* and *CYP1A1*2C* polymorphisms at the risk for developing breast cancer; to evaluate the association of polymorphisms and risk factors (age, smoking, alcohol, clinical features), tumor clinical and histopathologic features in breast cancer. **Methods:** This case-control study included 752 women, 219 patients and 533 controls. Molecular analysis were performed by PCR-multiplex (*GSTM1* null and *GSTT1* null), PCR-RFLP (*CYP1A1*2A*) and real-time PCR (*CYP1A1*2C*). For the statistical analysis, the MINITAB 16.0 (Multiple Logistic Regression Test), SNPstats (Inheritance Model tests) and BioEstat 5.0 (Hardy-Weinberg test) tests were used. **Results:** Women with old age and the alcohol consumption had increased risk for developing breast cancer. Women with breast cancer had slightly higher frequency (51%) of the *GSTM1 null* genotype than women without cancer (49%), however this difference was not significant statistically. *GSTT1 null* genotype was also not associated with breast cancer. *CYP1A1*2A* polymorphism was associated with the risk for breast cancer and *CYP1A1*2C* polymorphism was more frequent in tumors with no distant metastases. **Conclusions:** Women with age advanced and who drink alcohol present increased risk for developing breast cancer. *CYP1A1*2A* polymorphism is associated with breast cancer and *CYP1A1*2C* polymorphism is related to women with no distant

metastases. The polymorphisms of the *GSTM1* and *GSTT1* genes are not associated with the development of breast cancer.

Keywords: Breast cancer; genetic polymorphism; xenobiotic; cytochrome P450; glutathione transferase.

1.INTRODUÇÃO

1. Introdução

Câncer é uma malignidade celular cuja característica é a perda dos controles normais que resultam em crescimento desregulado, ausência de diferenciação celular, invasão de tecidos locais e metastatização. As células que perderam a capacidade de responder aos mecanismos de controle normal do crescimento e que se multiplicam de modo descontrolado são consideradas células transformadas ou neoplásicas, no qual neoplasia significa literalmente o processo de um “novo crescimento”.^(1,2,3)

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Anualmente são estimados 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo ⁽⁵⁾. A estimativa mundial para 2020 é de 10,3 milhões de mortes por câncer. América do Sul, América Central, África e Ásia são responsáveis por 60% dos novos casos e 70% dos óbitos por câncer. No Brasil, a estimativa para 2016 e 2017 é de aproximadamente 596 mil novos casos de câncer, com cerca de 300 mil somente em mulheres.⁽⁶⁾

As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo e ambas estão inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão relacionadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas ⁽⁸¹⁾. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. De uma maneira geral, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais.⁽⁴⁾

Entre todos os tipos de neoplasias, o câncer de mama se destaca como a principal causa de mortes em mulheres, corresponde a 25% dos novos casos, 14% do

total de óbitos e a estimativa é de que esse tipo de neoplasia seja responsável por 60% das mortes por câncer de mama em países em desenvolvimento. ⁽⁷⁾

Cerca de 1,38 milhões de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama e 520.000 casos de morte por esta doença são identificados todos os anos no mundo ⁽⁸⁾. No Brasil, a neoplasia mamária é a principal causa de mortes entre as mulheres desde 1979 ⁽⁴⁾. Este tipo de neoplasia é responsável por 70% das mortes em mulheres que vivem nos países de média e baixa renda ⁽⁹⁾. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 ocorreu um aumento de 10 vezes no número de casos de câncer de mama em todo o mundo ⁽⁴⁾. Na América Latina são diagnosticados cerca de 115.000 novos casos, todos os anos, e no Brasil a estatística ultrapassa 57.960 casos em 2016^(4,9).

O carcinoma mamário apresenta bom prognóstico se diagnosticado em fase inicial. A sobrevivência de cinco anos nos países em desenvolvimento é de 50% a 60%, enquanto que nos países desenvolvidos é de 85%. Se diagnosticado em estágio avançado a taxa de mortalidade é alta. É a segunda maior causa de morte por câncer em países desenvolvidos, ficando abaixo apenas para o câncer de pulmão. Em contrapartida é a primeira causa de morte por câncer em países em desenvolvimento ^(4,10).

Além dos fatores ambientais e genéticos ⁽¹¹⁾, a idade e fatores endócrinos ⁽¹²⁾ também apresentam importância no desenvolvimento do câncer de mama. Os fatores endócrinos estão relacionados principalmente ao estímulo estrogênico, seja endógeno ou exógeno, com aumento do risco quanto maior o tempo de exposição ao hormônio por diversas vias como ingestão, liberação e estímulo hormonal durante a vida ⁽¹³⁾.

Apresentam risco aumentado para esse tipo de câncer mulheres com história de menarca precoce (idade da primeira menstruação menor que 12 anos), menopausa tardia (após os 50 anos de idade), primeira gravidez após 30 anos de idade, nuliparidade

(nunca ter filhos) e terapia de reposição hormonal pós-menopausa, principalmente se prolongada por mais de cinco anos ^(4,11). Outros fatores incluem a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 40 anos, ingestão regular de bebida alcoólica, mesmo que em quantidade moderada (30g/dia), obesidade, principalmente quando o aumento de peso se dá após a menopausa, e sedentarismo ⁽¹⁴⁾. História familiar de câncer de mama, principalmente em parentes de primeiro grau antes dos 50 anos, é importante fator de risco para o câncer de mama e pode indicar predisposição genética associada à presença de mutações em determinados genes ⁽⁴⁾.

A prevenção primária da neoplasia de mama ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e as características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Um importante desafio à pesquisa do câncer é entender como essas alterações genéticas estão associadas à tumorigênese, contribuindo para as alterações celulares e biológicas que podem ser reconhecidas como malignas. As neoplasias podem ocorrer nas formas esporádicas e hereditárias ⁽¹⁵⁾.

Devido à sua importância, a investigação de fatores genéticos relacionados ao risco de desenvolver neoplasia mamária poderá contribuir para o conhecimento e gerenciamento de tratamentos desse tipo tumoral ^(16,17). Tecnologias aplicadas nos estudos de DNA, RNA e do perfil das proteínas, podem ser usadas para retratar um fenótipo detalhado do tumor ^(3,12,18,19).

Características clínicas do câncer de mama

O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea, que necessita de uma grande variedade de tratamentos e conduz à resultados diferentes ⁽²⁰⁾. Deste modo a classificação prognóstica atual considera os subtipos histológicos, como o carcinoma *in situ*, que atinge ductos e lóbulos e a princípio não teria a capacidade de desenvolver metástase; carcinoma invasivo ou infiltrante, que atinge ductos e lóbulos e tem capacidade de desenvolver metástase; e o carcinoma invasivo, o mais comum (mais de 80% dos casos) e têm origem no epitélio ductal ⁽²¹⁾.

Os tumores são classificados de acordo com os parâmetros de TNM, nos quais são considerados a extensão anatômica da doença que são: tamanho do tumor (T), comprometimento de linfonodos regionais (N) e metástase à distância (M). Essa classificação é realizada de acordo com a União Internacional Contra o Câncer (UICC) ⁽²²⁾.

Tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e respostas terapêuticas ^(4,23,24). A classificação prognóstica atual considera, além das classificações histológicas e TNM, os subtipos moleculares do carcinoma de mama que podem exigir terapêutica específica ^(25,26,27). Essa classificação considera a presença/ausência de receptores hormonais (estrogênio e progesterona), amplificação e/ou superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor – type 2 - HER2*) e índice de proliferação celular (Ki-67). Essa classificação fenotípica consiste em ^(23,24,28,29):

- Luminal A: tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 e Ki-67 <14%;

- Luminal B: tumores positivos para RE e/ou RP, positivo para HER2 ou quando HER2 negativo apresentar Ki-67 >14%;
- Superexpressão de HER2: tumores negativos para RE e RP e positivo para HER2;
- Triplo Negativo: tumores negativos para RE, RP e HER2.

Metabolismo de xenobióticos

Alguns indivíduos podem apresentar risco aumentado para o desenvolvimento do câncer devido às diferenças no biometabolismo. Desse modo, polimorfismos nos genes que codificam as enzimas metabolizadoras de xenobióticos podem ter significativo papel no risco para as neoplasias de mama ⁽³⁰⁾. Assim, polimorfismos nesses genes, como os membros da família do *Citocromo P450 (CYP)* e *Glutathionas-S-Transferase (GSTs)*, tem sido associados à carcinogênese mamária ^(31,32).

A maquinaria de metabolização xenobiótica é constituída principalmente por dois tipos de enzimas, as do metabolismo oxidativo de Fase I e as enzimas conjugadas de Fase II. Neste metabolismo os compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas de Fase I que são, principalmente, representadas pelas enzimas da superfamília do Citocromo P450 (CYPs). Desta forma, por meio da adição de um ou mais grupos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno. ^(33,34)

As reações da Fase II envolvem a conjugação com o substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) principalmente por meio da ação das Glutathionas-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos ativados na Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção. Polimorfismos em genes que codificam

essas enzimas do metabolismo de xenobióticos podem alterar sua expressão ou função, e conseqüentemente modificar a ativação ou detoxificação de compostos carcinogênicos.^(35,36,37,38,82,83) Estes genes são importantes para o desenvolvimento do câncer de mama devido ao seu envolvimento no metabolismo das substâncias cancerígenas como compostos exógenos que podem ser genotóxicos e hormônios esteróides.⁽¹¹⁾

Em relação à superfamília *CYP*, o gene *CYP1A1* apresenta grande importância no processo da carcinogênese humana. O gene *CYP1A1*, localizado no cromossomo 15, região cromossômica 15q22q24 tem como produto funcional a enzima aril-hidrocarboneto hidroxilase (AHH). O polimorfismo *CYP1A1*2A* está localizado na posição 3798 do gene, correspondente a região não codificante 3' da cauda poli (A). Este polimorfismo resulta na transição de timina para citosina (T>C) resultando em uma sequência de reconhecimento da enzima de restrição *MspI*. O polimorfismo *CYP1A1*2C*, localizado na posição 2454 do gene, é caracterizado pela transição de adenina para guanina (A>G).⁽⁷⁰⁾ O gene que codifica esta enzima contém dois sítios polimórficos que definem os polimorfismos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* associados com câncer de pulmão e mama.⁽³⁹⁾

Estudos têm demonstrado uma associação entre o risco de diferentes tipos de câncer e os genótipos polimórficos resultantes dos polimorfismos em genes *CYPs*, como polimorfismo *CYP1A1*2A* e cânceres: oral,⁽⁷³⁾ pulmão,⁽⁷⁴⁾ cervical,⁽⁷⁵⁾ trato aerodigestivo superior,⁽⁷⁶⁾ cabeça e pescoço.^(77,82) O polimorfismo *CYP1A1*2C* é associado com câncer de cabeça e pescoço^(77,78,82) laringe e hipofaringe.⁽⁷⁹⁾

As GSTs são consideradas enzimas chave na fase II do metabolismo de xenobióticos, uma vez que participam de processos críticos na proteção contra o estresse oxidativo.⁽⁸⁴⁾ Os genes *GSTM1* e *GSTT1* também são importantes na

detoxificação de carcinógenos. O gene *Glutathione S-transferase mu*—*GSTM1* está localizado na região cromossômica 1p13.3 do cromossomo 1, e o gene *Glutathione S-transferase teta*—*GSTT1* na região cromossômica 22q11.2 do cromossomo 22. Estes genes apresentam deleções gênicas representadas pelos genótipos polimórficos *GSTM1* e *GSTT1* nulos, que conseqüentemente resultam em perda da atividade enzimática.^(40,41,80)

Polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos podem modificar as funções destas enzimas, resultando na alteração da ativação ou desintoxicação de substâncias cancerígenas, tais como os metabólitos presentes no cigarro e em bebidas alcoólicas.^(38,42,43,44,45) Deste modo, polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* podem influenciar o desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo bexiga, testículos, próstata,^(46,47) pulmão,⁽⁴⁸⁾ esôfago,^(49,50) fígado,⁽⁵¹⁾ cólon,⁽⁵²⁾ carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço^(53,54,55,56,57,58,59,83) e mama.^(19,60,61,62,63,64,65)

Alguns polimorfismos de GST são associados ao resultado de tratamentos em pacientes com câncer de mama. Mais especificamente, polimorfismos de deleção nos genes *GSTM1* e *GSTT1* podem resultar na alteração da atividade enzimática. Resultados de estudos sugerem que a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer de mama pode ser modulada pela presença dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1*.^(65,67,68,69)

1.1 Objetivos

Objetivo geral

Identificação de variantes genéticas dos genes *CYP1A1*, *GSTT1* e *GSTM1* e fatores de risco para o carcinoma mamário.

Objetivos específicos

- 1 - Avaliar a associação dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* e o risco para o desenvolvimento de tumores de mama;
- 2 - Analisar a influência de fatores de risco no desenvolvimento de tumores mamários;
- 3 - Avaliar a interação entre os polimorfismos e os fatores de risco no desenvolvimento do câncer de mama;
- 4 - Investigar a associação dos polimorfismos com parâmetros clínicos e histopatológicos do câncer de mama e progressão do tumor.

2. Artigos Científicos

2. Artigos Científicos

Os resultados referentes à esta dissertação estão apresentados em forma de artigos. No total estão apresentados dois artigos que serão submetidos à publicação.

Artigo I

Título: *Evaluation of molecular markers GSTM1 and GSTT1 and clinical factors in breast cancer.*

Autores: **Stéphanie Piacenti dos Santos**, Sabrina Sayuri Morissugui, Anelise Russo, Ana Paula D'Alarme Gimenez Martins, José Luis Esteves Francisco, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo.

Periódico: *Plos One*, a ser submetido.

Artigo II

Título: *Avaliação do gene CYP1A1 em pacientes com câncer de mama.*

Autores: **Stéphanie Piacenti dos Santos**; Anelise Russo; Ana Paula D'Alarme Gimenez Martins; José Luis Esteves Francisco; Érika Cristina Pavarino; Eny Maria Goloni-Bertollo.

Periódico: *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, a ser submetido

Artigo Científico I

Artigo I

Título: *Evaluation of molecular markers GSTM1 and GSTT1 and clinical factors in breast cancer.*

Autores: **Stéphanie Piacenti dos Santos**, Sabrina Sayuri Morissugui, Anelise Russo, Ana Paula D'Alarme Gimenez Martins, José Luis Esteves Francisco, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo.

Periódico: *Plos One*, a ser submetido.

Evaluation of molecular markers *GSTM1* and *GSTT1* and clinical factors in breast cancer

Authors: Stéphanie Piacenti dos Santos¹, Sabrina Sayuri Morissugui¹, Anelise Russo¹, Ana Paula D'Alarme Gimenez Martins¹, José Luis Esteves Francisco², Érika Cristina Pavarino¹, Eny Maria Goloni-Bertollo¹

¹Genetics and Molecular Biology Research Unit – UPGEM, São José do Rio Preto Medical School – FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

²Department of Gynecology and Obstetrics, São José do Rio Preto Medical School – FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

Corresponding author

Eny Maria Goloni Bertollo

Genetics and Molecular Biology Research Unit – UPGEM

Av Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP, Brazil

CEP: 15090-000

Phone: +55 17 32015720

E-mail: eny.goloni@famerp.br

Summary

Introduction: Genetic polymorphisms in genes of the superfamily of glutathione-S-transferases (*GSTM1* and *GSTT1*), which play a key role in the metabolism of xenobiotics, can be associated with susceptibility to the breast cancer development. The study was conducted to evaluate the frequency of polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* genes in women with breast cancer (patients) compared with those observed in women without history of cancer (controls), and the association of these polymorphisms with clinical/epidemiological parameters. **Materials and Methods:** Were evaluated 752 women (219 patients and 533 controls). Genomic DNA was extracted from blood samples and molecular analysis was performed by the Polymerase Chain Reaction (PCR). For statistical analysis, was used multiple logistic regression and descriptive statistics. **Results:** Statistics showed that age ≥ 50 years (OR = 3.22, 95% CI = 2.30 – 4.51, $p < 0.001$) and alcohol consumption (OR = 1.60, 95% CI = 1.13 – 2.27, $p = 0.008$) were associated to the breast cancer development, while smoking and *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes presented no association. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms presented no relationship with the clinical and histopathological parameters or molecular subtypes of breast cancer. Ninety-two percent of tumors were invasive ductal, 66% were grade II, 65% were larger than 2 cm, the stages II (35.3%) and III (31.2%) were the most prevalent, and 47.7% were molecular subtype luminal B. **Conclusion:** Individuals aged ≥ 50 years and alcohol consumers have more chance to developing breast cancer. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms are not associated to the risk of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, genetic polymorphism, glutathione transferase, xenobiotics.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy and the second leading cause of cancer-related death in women worldwide⁽¹⁾. In Brazil and most other countries the cases of this malignancy are still growing^(2,3). Therefore, this disease is an important public health problem that should be studied.

Although it is known that avoiding exposure to tobacco, maintaining a healthy weight, staying physically active throughout life, and consuming a healthy diet can substantially reduce the risk of developing cancer or dying from cancer⁽⁴⁾. The primary prevention of this malignancy is not completely possible due to the variety of risk factors and genetic alterations that are involved in the etiology⁽⁵⁾.

An important challenge in research about cancer is understand how these genetic alterations are associated with tumorigenesis. Some individuals have an increased risk of developing cancer because the differences in the biometabolism^(5,6).

The elimination of many xenobiotics from the body is mediated by two classes of enzymes sequentially: phase I oxidation enzymes, cytochrome P450 (CYP); and phase II enzymes, which include a variety of enzyme families such as N-acetylating enzymes (N-acetyltransferase – NAT), glutathione-S-transferases (GST) and methyltransferases (MT). Phase II enzymes promote the conjugation of the oxidized molecule with a functional group. This process becomes the metabolite more water-soluble and facilitates its elimination from the body⁽⁷⁾.

Polymorphisms of genes that encode enzymes involved in xenobiotic metabolism can modify the functions of these enzymes, resulting in the incorrect activation or detoxification of carcinogens, such as metabolites of tobacco and alcohol. Thus, polymorphisms of genes, such as members of the superfamily of cytochrome P450 (CYP)

and glutathione-S-transferase (GST) has been associated with carcinogenesis in several cancer types, including lung ⁽⁸⁾, prostate ⁽⁹⁾, colorectal ⁽¹⁰⁾, head and neck ^(11,13,46,47), esophagus ⁽¹⁴⁾, liver ⁽¹⁵⁾ and breast cancer ^(5,6,16,17).

Deletion polymorphism in *GSTM1* and *GSTT1* genes can result in no enzymatic activity and influence on treatments such as chemotherapies ^(18,20). However, the number of studies for each functional polymorphism is still very limited, making it difficult to confirm positive associations ⁽²¹⁾. Regarding the association of these polymorphisms with carcinogenesis, results of studies suggest that the susceptibility for breast cancer can be modulated by the presence of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes ^(22,23).

This study aimed to determine the frequency of polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* genes in a sample of women with breast cancer and a control group without breast cancer, and evaluate whether these variants are predictors for the development of breast cancer. The relation of these polymorphisms with clinical/ epidemiological parameters and risk factors such as obesity, exposure to alcohol and tobacco, nulliparity, and histopathological characteristics of the tumors were also investigated.

Materials and Methods

A total 752 women were included in this study, 219 women with histologically confirmed breast cancer, diagnosed at Serviço de Ginecologia e Obstetrícia/Unidade de Mastologia do Hospital de Base/Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São Paulo, Brazil, and 533 healthy women with no previous history of cancer and without family histories of cancers (controls).

The study was approved by *Comitê de Ética em Pesquisa* (CEP) of *Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto* (84397/2012) and *Comitê Nacional de Ética em Pesquisa* CONEP, and written consent was obtained from all participants.

Both cases and controls completed a questionnaire that assessed parameters such as social/epidemiological data (age and exposure to alcohol and tobacco). Cases were also questioned about body mass index (BMI) and number of pregnancies.

Medical records were also reviewed to obtain detailed clinicopathological information including stage of breast cancer tumor (based on the tumor size (T), lymph node involvement (N) and metastasis (M) according to the parameters of Union International Cancer Control (UICC)⁽⁴⁸⁾ e American Joint Committee for Cancer (AJCC) and molecular subtypes determined through immunohistochemical biomarkers: luminal A (Estrogen receptor (ER) positive and/or progesterin receptor (PR) positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER2) negative and proliferation marker Ki-67 <14%), luminal B (ER + and/or PR+, HER2 – and Ki-67 \geq 14% or ER + and/or PR+ and HER2 +), HER2 overexpressed (ER –, PR –, HER2 +) or triple negative (ER –, PR –, HER2 –)^(24,29).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood according to the technique of Miller et al. 1988, with modifications⁽³⁰⁾. Molecular analysis of *GSTM1* and *GSTT1* homozygous deletions was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR). The fragment of the *CYP1A1* gene was amplified in the same reaction to use as a positive control of the reaction.

PCR reaction was performed using 25 μ L of each primer, 1.5 mM of MgCl₂, 1.23 μ mol/L of each desoxynucleotide triphosphate, 1.5 U of Taq DNA polymerase (Fermentas), 100 ng of genomic DNA, using Mastercycler personal (Eppendorf). The reaction was preincubated for 4 min at 94°C for denaturation. PCR conditions were 2 min at 94°C, 1 min

at 59°C, and 1 min at 72°C, for 35 cycles. The final extension was performed at 72°C for 10 min. The amplified DNA was electrophoresed in 1.5% agarose gel stained with red gel, under constant current of 110V for 60 minutes and subsequent visualization in ultra-violet light.

To examine the association between genotypes and the development of breast cancer, we calculated the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs), using multiple logistic regression analysis with Minitab/ Windows - Version 12.22 and GraphPad InStat – version 3.0 software. P-values < 0.05 were considered statistically significant. The clinical and pathological features, such as tumor type, grade, size and classification of molecular subtypes of tumors were also analyzed by descriptive statistics.

Results

This study included a total number of 752 women, 219 diagnosed with breast cancer (patients) and 533 cancer free (controls). Multiple logistic regression evaluated the effects of the variables: age, smoking, alcohol drinking and polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* genes in the breast cancer development.

Age \geq 50 years (OR = 3.22, 95% CI = 2.30 – 4.51, p <0.001) and alcohol drinking (OR = 1.60, 95% CI = 1.13 – 2.27, p=0.008) showed significant association with the development of breast tumor. Breast cancer patients (51%) presented a slightly higher prevalence of the *GSTM1* null genotype compared to the controls (49%). However, this difference was not statistically significant. Similar to the *GSTM1* genotype, the presence of null genotype *GSTT1* was not associated with an increased risk for breast cancer (Table 1).

The patients were divided in two groups: patients without metastasis and patients with metastasis. Comparing the groups, no significant differences were observed in *GSTM1*

and *GSTT1* genotype frequencies, showing no relationship between these polymorphisms and the presence of metastasis. Age, tobacco or alcohol consumption, body mass index and parity were not associated to metastasis (Table 2).

We analyzed if null genotype of *GSTM1* and *GSTT1* could affect smokers or alcohol consumers in relation to the risk of breast cancer development, due to the critical role of GSTs in the elimination of exogenous carcinogenic compounds. However, no significant results were found.

In relation to clinical and histopathological parameters, the most common histological type was invasive ductal (92.2%), tumor grade II and T2 tumors (between 2 and 5 cm) were more frequent (66% and 31.6%, respectively), Stages II (35.3%) and III (31.2%) were the most prevalent. Luminal B was the most frequent molecular subtype among cases (47.7%) (Table 3). The polymorphisms were not associated with the molecular subtypes or TNM status of breast cancer (Table 4).

Discussion

This study showed that age ≥ 50 years can be a risk factor for the breast cancer development. This is in agreement with the literature that considers aging as risk factor in many cases of breast cancer ⁽³¹⁾. Regarding alcohol drinking, Coronado and colleagues, in review article in 2011, and others studies concluded that alcohol intake can be a risk factor for breast cancer. ^(32,33) The results of present study agree with these results, but disagree with a study that found no relationship between this habit and the development of breast cancer. ⁽³⁴⁾

Although study of Magnusson et al. (2007) indicate smoking as a risk factor for the development of breast cancer ⁽³⁵⁾. In this study this relationship was not found, as well as

various studies ^(34,36). However, the relative frequency shows that 33.5% of patients were smokers while 26.7% of controls were smokers.

The frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes observed in this study were not different from those described in previous publications involving subjects from Brazil ⁽³⁷⁾. We did not observe an association between the *GSTM1* null or the *GSTT1* null genotypes and an increased risk for breast cancer. This supports the findings of Zgheib et al. (2013) ⁽⁷⁾, Sohail et al. (2013) ⁽³⁶⁾, Chacko et al. (2005) ⁽³⁸⁾, and Unlu et al. (2008) ⁽³⁹⁾. However, in others studies the null *GSTM1* and *GSTT1* was associated with breast cancer risk ^(22,23). In contrast, Kaushal et al. (2010) ⁽¹⁶⁾ study showed that *GSTT1* null and *GSTM1* null genotypes conferred 41% less and 55% less reduced risk to breast cancer.

Comparing the patient groups with or without metastasis, no significant differences were found in *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms frequencies, showing that there is no relationship between these polymorphisms and the presence of metastasis. This result is not supported with concrete data in the literature, but it is possible that the absence of metastasis should be the best response to chemotherapy. Some studies showed that the *GSTM1* null genotype is associated with increased success in the treatment with chemotherapeutic drugs ^(18,19).

The high frequency of invasive ductal, higher than 80%, is also reported by studies about this type of carcinoma ⁽⁴⁰⁾. The histological grade of the tumor is one of the most consistent prognostic factors to guide adjuvant treatment in invasive breast carcinomas ⁽⁴¹⁾. In this study, similar to others described in literature, grade II tumors were more prevalent.

Regarding the tumor size, it is important emphasize that this is a determinant factor in indication of treatment. Some studies present higher prevalence of tumors smaller than 2

cm related to the best prognosis^(29,39). However, in this study only 23.4% of patients had tumors with these dimensions.

About the molecular subtype, luminal B was the most prevalent in the analyzed patients. There is a contradiction in relation to other studies, which showed the luminal subtype A, with a better prognosis, as the most frequent type^(29,42). *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms were not associated to the molecular subtypes or TNM status of breast cancer in the present study. There are few data about the frequency of *GST* genotypes according to the molecular subtypes in the literature. Significant *GSTT1* and *GSTM1* genotype-phenotype association were not also observed by Savukaitytė and colleagues in Lithuanian patients⁽⁴³⁾. In another study performed in Thailand the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms showed no significant association to the clinical and pathological parameters comprising lymph node, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER-2, tumor size and age at diagnosis of patients⁽⁴⁴⁾. Furthermore, in patients with invasive breast carcinoma the frequencies of *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms were not different according to the TNM status after chemotherapy⁽⁴⁵⁾.

Conclusion

Age \geq 50 years and alcohol consumption are risk factors for developing breast cancer. Patients in this study did not have so favorable prognosis, because the prevalence of tumors larger than 2 cm and luminal B molecular subtype. Considering the complex process of carcinogenesis and this multifactorial etiology, it is essential further studies to elucidate the association between these genetic polymorphisms in xenobiotic metabolizing genes and epidemiological variables of breast carcinoma.

Table 1. Epidemiological variables, risk factors and *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in breast cancer risk.

Variable		Cases	Controls	OR ^a (95% CI) ^b	P value
		(N=219)	(N=533)		
		N (%)	N (%)		
Age	<50	85 (38.8)	320 (60)	1 (reference)	
	≥50	134 (61.2)	213 (40)	3.22 (2.30 – 4.51)	< 0.001
Smoking	No	151 (69)	381 (71)	1 (reference)	
	Yes	68 (31)	152 (29)	1.01 (0.70 – 1.45)	0.970
Alcohol drinking	No	132 (60)	363 (68)	1 (reference)	
	Yes	87 (40)	170 (32)	1.60 (1.13 – 2.27)	0.008
<i>GSTM1</i>	Present	107 (49)	275 (51.6)	1 (reference)	
	Null	112 (51)	258 (48.40)	0.94 (0.68 – 1.30)	0.706
<i>GSTT1</i>	Present	167 (76)	400 (75)	1 (reference)	
	Null	52 (24)	133 (25)	1.00 (0.68 – 1.46)	0.981

^aOdds ratio; ^b 95% Confidence Interval.

Table 2. Epidemiological variables, risk factors and polymorphisms in metastasis risk.

Variables		Patients with	Patients	OR ^a (95% CI) ^b	P value
		Metastasis (N=118)	without Metastasis (N=94)		
		N (%)	N (%)		
Age (year)	<50	58 (49.15)	46 (49)	1 (reference)	
	≥50	60 (50.85)	48 (51)	0.89 (0.50 – 1.58)	0.697
Smoking	No	80 (67.8)	67 (71.3)	1 (reference)	
	Yes	38 (32.2)	27 (28.7)	1.23 (0.65 – 2.33)	0.518
Alcohol drinking	No	74 (62.7)	53 (56.4)	1 (reference)	
	Yes	44 (37.3)	41 (43.6)	0.70 (0.39 – 1.27)	0.242
BMI	≤ 25	33 (28)	30 (32)	1 (reference)	
	>25	85 (72)	64 (68)	1.25 (0.68 – 2.29)	0.479
Parity	1 +	106 (89.8)	82 (87.2)	1 (reference)	
	0	12 (10.2)	12 (12.8)	0.83 (0.34 – 1.99)	0.671
GSTMI	Present	60 (51)	42 (44.7)	1 (reference)	
	Null	58 (49)	52 (55.3)	0.78 (0.45 – 1.37)	0.391
GSTTI	Present	93 (78.8)	69 (73.4)	1 (reference)	
	Null	25 (21.2)	25 (26.6)	0.74 (0.38 – 1.43)	0.370

^a Odds ratio; ^b 95% Confidence Interval

Table 3. Clinicopathological characteristics of breast cancer.

Variable		Cases (N=218)*
		N(%)
Histology	Invasive ductal carcinoma	201 (92.2)
	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	3 (1.3)
	Invasive lobular carcinoma	2 (1.0)
Tumor Grade	I	38 (17.4)
	II	144 (66)
	III	36 (16.5)
Tumor Size	Tis	5 (2.3)
	T1	68 (31.2)
	T2	69 (31.6)
	T3	34 (15.6)
	T4	42 (19.3)
Stage	0	3 (1.4)
	I	32 (14.7)
	II	77 (35.3)
	III	68 (31.2)
	IV	38 (17.4)
Molecular Subtype	Luminal A/B(Hybrid)	27 (12.3)
	Luminal A	39 (18)
	Luminal B	104 (47.7)
	HER2 overexpressed	18 (8)
	Triple negative	30 (14)

*Numbers may not add up to 218 because of missing data.

Table 4. Association between *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and clinical and histopathological characteristics of breast cancer.

Clinical and histopathological Parameters	N(%)	<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>	
		OR ^a (95% CI) ^b	P value	OR ^a (95% CI) ^b	P value
Luminal A					
LumB/HER-2/Triple	168(81.6)	1(Reference)		1(Reference)	
Luminal A	38(18.4)	0.91(0.44-1.87)	0.788	1.38(0.59-3.19)	0.456
Luminal B					
LumA/HER-2/Triple	86(41.8)	1(Reference)		1(Reference)	
Luminal B	120(58.2)	1.42(0.80-2.52)	0.233	0.71(0.36-1.39)	0.319
HER-2					
LumA/LumB/Triple	188(91.3)	1(Reference)		1(Reference)	
HER-2	18(8.7)	0.83(0.31-2.23)	0.709	0.58(0.15-2.16)	0.415
Triple negative					
LumA/LumB/HER-2/Lum Hib	176(85.4)	1(Reference)		1(Reference)	
Triple negative	30(14.6)	0.63(0.28-1.44)	0.274	1.78(0.74-4.30)	0.201
TNM status					
Stage I / II	112 (51.4)	1(Reference)		1(Reference)	
Stage III / IV	106 (48.6)	0.89 (0.51-1.55)	0.692	0.93 (0.48-1.79)	0.827

^a Odds ratio; ^b 95% Confidence Interval.

References

1. Jemal ADVM, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, et al. (2011) Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.
2. Instituto Nacional do Câncer – <http://www.inca.gov.br>. Accessed in: 16/06/2014.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013) Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63(1): 11-30.
4. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, et al. (2012) American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 62: 30-67.
5. Shimada N, Iwasaki M, Kasuga Y, et al. (2009) Genetic polymorphisms in estrogen metabolism and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilian and non Japanese Brazilians. *J Hum Genet* 54(4): 209-15.
6. Tserga A, Michalopoulos NV, Levidou G, Korkolopoulou P, et al. (2012) Association of aberrant DNA methylation with clinico pathological features in breast cancer. *Oncol Rep* 27(5): 1630-8.
7. Zgheib NK, Shamseddine AA, Geryess E, Tfayli A, Bazarbachi A, et al. (2013) Genetic polymorphisms of CYP2E1, GST, and NAT2 enzymes are not associated with risk of breast cancer in a sample of Lebanese women. *Mutat Res* 747-748: 40-47.
8. Ada AO, Kunak S, Hancer F, Bilgen S, Suzen SH. (2010) CYP and GST polymorphisms and survival in advanced non-small cell lung cancer patients. *Neoplasma* 57(6): 512-21.
9. Lavender NA, Benford ML, VanCleave TT, Brock GN, Kittles RA, et al. (2009) Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and

- prostate cancer risk among Men of African Descent: A case-control study. *BMC Cancer* 9: 397.
10. Economopoulos KP, Sergentanis TN. (2010) GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer* 46(9): 1617-1631.
11. Leme CV, Raposo LS, Ruiz MT, Biselli JM, Galbiatti AL, et al. (2010) GSTM1 and GSTT1 genes analysis in head and neck cancer patients. *Rev Assoc Med Bras* 56(3): 299-303.
12. Varela-Lema L, Taioli E, Ruano-Ravina A, Barros-Dios JM, Anantharaman D, et al. (2008) Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC. *Genet Med* 10(6): 369-84.
13. Sam SS, Vinod Thomas KS, Reddy J. (2010) Gene-environment interactions associated with CYP1A1 MspI and GST polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *Cancer Res Clin Oncol* 136: 945-951.
14. Li D, Dandara C, Parker MI. (2010) The 341C/T polymorphism in the GSTP1 gene is associated with increased risk of esophageal cancer. *BMC Genet* 11: 47.
15. Wang B, Huang G, Wang D, Li A, Xu Z, et al. (2010) Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *J Hepatol* 53(3): 508-18.
16. Kaushal M, Mishra AK, Raju BS, Ihsan R, Chakraborty A, et al. (2010) Betel quid chewing as an environmental risk factor for breast cancer. *Mutat Res* 703: 143-8.
17. Jardim BV, Moschetta MG, Gelaleti GB, Leonel C, Regiani VR, et al. (2012) Glutathione transferase pi (GSTpi) expression in breast cancer: An immunohistochemical and molecular study. *Acta Histochem.* 2012; 114: 110-117.

18. Oliveira AL, Rodrigues FFO, Santos RE, Aoki T, Rocha MN, et al. (2010) GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Genet Mol Res* 9: 1045–1053.
19. Mishra A, Chandra R, Mehrotra PK, Bajpai P, Agrawal D. (2011) Glutathione-S-transferase M1 and T1 polymorphism and response to neoadjuvant chemotherapy (CAF) in breast cancer patients. *Surg Today* 41: 471-476.
20. Saadat M, Khalili M, Nasiri M, Rajaei M, Omidvari S, et al. (2012) Clinical response to chemotherapy in locally advanced breast cancer was not associated with several polymorphisms in detoxification enzymes and DNA repair genes. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 117–119.
21. Vianna-Jorge R, Festa-Vasconcellos JS, Goulart-Citrangulo SMT, Leite MS. (2013) Functional polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes and their impact on the therapy of breast cancer. *Front Genet* 3: 1-19.
22. Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld L. (2011) Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population. *Mol Cell Biochem* 355, 265–271.
23. Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld-Granadeiro LA. (2012) Positive association of polymorphisms in estrogen biosynthesis gene, CYP19A1, and metabolism, GST, in breast cancer susceptibility. *DNA Cell Biol* 31: 1100-1106.
24. Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, et al. (2012) Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol Rep* 27: 28-38.

25. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, et al. (2009) Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101(10): 736-50.
26. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ, Ozbek U, Soran A, et al. (2010) Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 116(6): 1431-9.
27. Cheang MCU, Treaba DO, Speers CH, Olivotto IA, Bajdik CD, et al. (2006) Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody sp1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. *J Clin Oncol* 24(36): 5637-44.
28. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, et al. (2010) American Society of Clinical Oncology. College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 28(16): 2784-95
29. Devi CRB, Tang TS, Corbex M. (2012) Incidence and risk factors for breast cancer subtypes in three distinct South-East Asian ethnic groups: Chinese, Malay and natives of Sarawak, Malaysia. *Int J Cancer* 131: 2869-2877.
30. Miller SA, Dikes DD e Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
31. Minister of Public Works and Government Services (Canada). (2011) Review of lifestyle and environmental risk factors for breast cancer: summary report.
32. Coronado GD, Beasley J, Livaudais J. (2011) Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *Salud Publica Mex* 53: 440-447.

33. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. (2001) Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2: 133-140.
34. Gibson LJ, Hery C, Mitton N, Gines-Bautista A, Parkin DM, et al. (2010) Risk factors for breast cancer among Filipino women in Manila. *Int J Cancer* 126: 515- 521.
35. Magnusson C, Wedren S, Rosenberg LU. (2007) Cigarette smoking and breast cancer risk: a population-based study in Sweden. *Br J Cancer* 97(9): 1287–1290.
36. Sohail A, Kanwal N, Ali M, Sadia S, Massod AI, et al. (2013) Effects of glutathione-S-transferase polymorphisms on the risk of breast cancer: A population-based case–control study. *Environ Toxicol Pharmacol* 35: 43-53.
37. Aguiar ES, Giacomazzi J, Schmidt AV, Bock H, Saraiva-Pereira ML, et al. (2012) GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening. *Rev Bras Epidemiol* 15(2): 246-255.
38. Chacko P, Joseph T, Mathew BS, Rajan B, Pillai MR. (2005) Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome. *Mutat Res* 581: 153-163.
39. Unlu A, Ates NA, Tamer L, Ates C. (2008) Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk. *Cell Biochem Funct* 26: 643–647.
40. Morais LMTS, Cardoso-Filho C, Lourenço GJ, Shinzato JY, Zeferino LC, et al. (2008) Características mamográficas do câncer de mama associadas aos polimorfismos GSTM1 e GSTT1. *AMB Rev Assoc Med Bras* 54(1): 61-66.
41. Reyat F, Bollet MA, Caly M, Gentien D, Carpentier S, et al. (2012) Respective Prognostic Value of Genomic Grade and Histological Proliferation Markers in Early Stage (pN0) Breast Carcinoma. *PLoS One* 7(4): e35184.

42. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. (2011) Molecular subtypes of breast cancer. *Femina* 39: 499-503.
43. Savukaitytė A, Ugenskienė R, Jankauskaitė R, Čereškevičius D, Šepetauskienė E, et al. (2015) Investigation of prognostic value of polymorphisms within estrogen metabolizing genes in Lithuanian breast cancer patients. *BMC Med Genet* 4;16:2.
44. Pongtheerat T, Tretrisool M, Purisa W. (2009) Glutathione s-transferase polymorphisms in breast cancers of Thai patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 10(1):127-32.
45. Yang G, Shu XO, Ruan ZX, Cai QY, Jin F, et al. (2005) Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer* 1;103(1):52-8.
46. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, et al. Polymorphisms of the *CYP1A1* and *CYP2E1* genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(2):1055-63.
47. Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, et al. Association between *GSTP1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep.* 2013; 40:4181-8.
48. União Internacional Contra o Câncer (UICC) - TNM: classificação de tumores malignos. Instituto Nacional de Câncer. Traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6ª edição - Rio de Janeiro: INCA 2004; 254.

Artigo Científico II

Artigo II

Título: Avaliação de genes CYPs em pacientes com câncer de mama

Autores: Stéphanie Piacenti dos Santos; Anelise Russo; Ana Paula D'Alarme Gimenez Martins; José Luis Esteves Francisco; Érika Cristina Pavarino; Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, a ser submetido

Avaliação de genes CYPs em pacientes com câncer de mama

Autores: Stéphanie Piacenti dos Santos¹; Anelise Russo¹; Ana Paula D'Alarme Gimenez Martins¹; José Luis Esteves Francisco²; Érika Cristina Pavarino¹; Eny Maria Goloni-Bertollo¹

¹Genetics and Molecular Biology Research Unit – UPGEM, São José do Rio Preto Medical School – FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

²Department of Gynecology and Obstetrics, São José do Rio Preto Medical School – FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

Autor correspondente

Eny Maria Goloni Bertollo

Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM

Av Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP, Brazil

CEP: 15090-000

Telephone: +55 17 32015720

E-mail: eny.goloni@famerp.br

RESUMO

Introdução: As enzimas codificadas pelos genes da superfamília Citocromo P450 desempenham um papel fundamental no metabolismo de xenobióticos e os polimorfismos genéticos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* podem estar associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama.

Objetivo: O presente estudo foi realizado para avaliar os polimorfismos *CYP1A1*2A* (rs4646903) e *CYP1A1*2C* (rs1048943) em mulheres com câncer de mama (pacientes) comparado com os indivíduos sem histórico de câncer (controles), no risco de desenvolver câncer de mama, e investigar a associação desses polimorfismos com parâmetros epidemiológicos, clínicos e histopatológicos dos tumores.

Casuística e métodos: Foram incluídos 752 indivíduos no estudo, 219 pacientes e 533 controles. A análise molecular foi realizada por meio de PCR-RFLP e PCR em tempo real. Para a análise estatística foram realizados os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg, regressão logística múltipla e foram considerados significantes intervalo de confiança de 95% e valor de $p \leq 0,05$.

Resultados: O polimorfismo *CYP1A1*2A* foi associado com risco para o câncer de mama, nos modelos de herança investigados. Mulheres com idade avançada (OR=2,44; IC 95%=1,76-3,39; $p < 0,001$) e hábito etilista (OR=1,46; IC 95%=1,04-2,06; $p = 0,030$) apresentaram risco aumentado para desenvolvimento de câncer de mama. O polimorfismo *CYP1A1*2C* (OR=0,18; IC 95%=0,05-0,63; $p = 0,007$) foi mais frequente em tumores com ausência de metástase à distância.

Conclusão: Indivíduos com idade avançada, hábito etilista e o polimorfismo *CYP1A1*2A* apresentam risco aumentado para desenvolver câncer de mama. O polimorfismo

*CYP1A1**2C está relacionado às mulheres com ausência de metástase à distância. Nossos achados mostram que os polimorfismos no gene *CYP1A1* podem modular o risco para câncer de mama, bem como de malignização tumoral com metástase à distância, embora estudos futuros com expansão do grupo amostral sejam necessários para melhor compreensão do papel desses polimorfismos na carcinogênese mamária.

Palavras chave: Câncer de mama; polimorfismo genético; Citocromo P450; xenobióticos.

Introdução

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012⁽¹⁾. Em mulheres, o câncer de mama é o mais recorrente, com maior frequência em 140 países do mundo, nos quais é a principal causa de morte⁽²⁾.

De acordo com a Agência internacional de Pesquisas sobre o câncer, os principais fatores de risco incluem agentes infecciosos (*Human Papiloma Virus* - HPV e Hepatite C), fatores reprodutivos, hormonais, exposição aos raios ultravioleta, alterações genéticas (polimorfismos e mutações) que influenciam o metabolismo de xenobióticos, tais como a ingestão hormonal, dieta não saudável, tabaco, álcool e poluentes ambientais.⁽³⁾

Em relação ao câncer de mama, os distúrbios hormonais, terapia de reposição hormonal, anticoncepcionais orais, obesidade e sedentarismo são fatores de risco já estabelecidos pela literatura. Além disso, nuliparidade e ausência de amamentação podem conferir maior susceptibilidade para o desenvolvimento do carcinoma mamário^(2,4,5).

Os xenobióticos podem ser endógenos, provenientes de reações bioquímicas, ou exógenos, ingeridos a partir de aditivos alimentares, medicamentos, tabaco, álcool,

poluentes presentes no ar ou na água, hormônios sintéticos, entre outros. Tais compostos são inicialmente transformados para serem removidos do organismo.⁽⁶⁻⁸⁾

Essa transformação ou biotransformação ocorre no metabolismo de xenobióticos. Na Fase I, os compostos endógenos e exógenos são submetidos à redução, oxidação ou hidroxilação produzindo metabólitos mais polares principalmente pelas enzimas Citocromo P450 (CYPs). Na Fase II, os metabólitos da Fase I são conjugados gerando compostos inativos e solúveis em água, que podem ser facilmente excretados. As reações de conjugação são realizadas principalmente pelas enzimas glutatona-S-transferase (GSTs). Finalmente, na Fase III por meio de proteínas transmembranas os compostos solúveis são transportados para o meio extracelular para posterior excreção.⁽⁹⁻¹¹⁻¹⁵⁾

Até o presente, vários polimorfismos foram descritos no gene *CYP1A1*, localizado no cromossomo 15 (15q22-q24). O polimorfismo *CYP1A1*2A* está localizado na posição 3798 do gene, correspondente a região não codificante 3' da cauda poli (A). Este polimorfismo resulta na transição de timina para citosina (T>C) resultando em uma sequência de reconhecimento da enzima de restrição *MspI*. O polimorfismo *CYP1A1*2C*, localizado na posição 2454 do gene, é caracterizado pela transição de adenina para guanina (A>G).⁽¹²⁾

O metabolismo xenobiótico atua na detoxificação do organismo, e a presença de variantes polimórficas nos genes que codificam as enzimas envolvidas podem causar alterações metabólicas, contribuindo para a carcinogênese^(6,13-15). Polimorfismos no gene *CYP1A1* foram associados com câncer de mama,⁽¹⁶⁾ e outros tipos de câncer, como cabeça e pescoço,⁽¹⁵⁻¹⁷⁻²⁰⁾ pulmão,⁽²¹⁾ cervical⁽²²⁾ e trato aerodigestivo superior.⁽²³⁾

A identificação da associação desses polimorfismos, fatores epidemiológicos, clínicos, patológicos e em mulheres com carcinoma de mama poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos no processo neoplásico, além de colaborar no

diagnóstico, prognóstico e tratamento. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influencia dos polimorfismos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* no desenvolvimento do câncer de mama.

Casuística e métodos

Grupo amostral: O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (parecer: 84397/2012). Foram incluídas 752 mulheres, 219 pacientes com câncer de mama (grupo caso) e 533 mulheres saudáveis sem história de câncer na família (grupo controle), após assinar do termo de consentimento livre esclarecido e entrevista com questionário padronizado para obtenção dos dados sócio demográficos. Os parâmetros clínicos e histopatológicos dos pacientes foram obtidos por meio de prontuário médico.

O critério de inclusão dos pacientes no grupo caso foi pertencer ao gênero feminino com confirmação patológica de câncer de mama por biópsia, provenientes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia/Unidade de Mastologia do Hospital de Base/FAMERP. Deste modo, os critérios de exclusão foram pertencer ao gênero masculino e ausência de confirmação patológica de carcinoma mamário.

Para o grupo controle, os critérios de inclusão foram: indivíduos saudáveis sem história de câncer na família incluídos aleatoriamente, pertencer ao gênero feminino, com idade igual ou acima de 40 anos. Os critérios de exclusão foram: história de câncer familiar, gênero masculino e indivíduos abaixo de 40 anos.

Foram avaliados os fatores de risco e os parâmetros clínicos e histopatológicos relacionados ao câncer de mama. Para o hábito tabagista, foram considerados fumantes os indivíduos que fumaram pelo menos 10 pacotes de cigarro por ano (>100 cigarros durante a

vida).⁽²⁴⁾ Foram considerados etilistas os indivíduos que consumiram >1 drink por semana (um drink foi definido aproximadamente como 1,5 oz ou ~44 mL de pinga, 4 oz ou ~118 mL de vinho contendo 12% de álcool e 12 oz ou ~350 mL de cerveja).⁽²⁴⁾

A classificação dos parâmetros clínicos e histopatológicos foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pela União Internacional Contra o Câncer.⁽²⁵⁾ Os tumores foram classificados em relação à extensão tumoral (T), comprometimento de linfonodos (N) e metástase à distância (M) (Tabela 1). A classificação T foi dividida em tumores de pequena extensão (T1, T2) e de grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dicotomizada em comprometimento de linfonodos negativo (N0) e positivo (N1, N2, N3). Para a classificação M foram consideradas ausência (M0) de metástase à distância ou presença (M1). O estadiamento tumoral foi classificado de acordo com o TNM⁽²⁵⁾. Os tumores foram divididos em não avançado (estádios: 0, I, IIA e IIB) e avançado (estádios: IIIA, IIIB, IIIC e IV).

De acordo com as características de diferenciação celular, os tumores foram divididos em mais diferenciado (grau I, bem diferenciado; e grau II, moderadamente diferenciado) e menos diferenciado (grau III, pouco diferenciado; e grau IV, indiferenciado).⁽²⁵⁻²⁸⁾

A classificação prognóstica atual considera, além das classificações histológicas e TNM, os subtipos moleculares do carcinoma de mama que podem exigir terapêutica específica.⁽²⁹⁻³¹⁾ Essa classificação considera a presença/ausência dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), amplificação e/ou superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e índice de proliferação celular (Ki-67). Essa classificação fenotípica consiste em: Luminal A (RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-

67<14%); Luminal B (RE+ e/ou RP+, HER2+ ou HER2- e Ki-67≥14%); Superexpressão de HER2 (RE-, RP- e HER2+); e Triplo Negativo (RE-, RP- e HER2-).^(27,28,32,33)

Outros fatores de risco investigados incluíram terapia hormonal,^(34,35) obesidade ou sobrepeso, definido pelo índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 25 Kg/m² ^(36,37) e nuliparidade,^(34,38,39) associados com maior suscetibilidade de desenvolver o carcinoma mamário.

Análise Molecular

O DNA genômico de leucócitos de sangue periférico do grupo amostral foi extraído segundo a técnica proposta por Miller et al. (1988)⁽⁴⁰⁾ com modificações, e armazenado em freezer -70°C para a posterior genotipagem.

A metodologia de Reação de Cadeia da Polimerase – Polimorfismos de Comprimentos de Fragmento de Restrição (*Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*) foi utilizada para genotipar o polimorfismo *CYP1A1*2A* (rs4646903), com a enzima de restrição *MspI*.⁽⁴¹⁾ A reação foi realizada com volume final de 25µL: 1X de tampão 10X, e 0,8mM /µL de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 0,5pmol de oligonucleotídeos iniciadores, H₂O, 100ng de DNA genômico e 1U de Taq DNA Polimerase Platinum. O material foi processado em termociclador automático e posteriormente submetido à digestão enzimática.

Para análise do polimorfismo *CYP1A1*2C* (A>G), na posição 2454 do gene (rs1048943) foi realizada a reação de PCR em tempo real em volume final de 10 µL contendo 10ng de DNA genômico, *Taqman Universal PCR Master Mix 1X* e *TaqMan® SNP Genotyping Assay* (Assay ID C_25624888_50) (*Applied Biosystems*), de acordo com

protocolo do fabricante. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, no equipamento *Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

Análise estatística

As estatísticas descritivas incluíram valores médios \pm desvio padrão para dados contínuos e porcentagem para dados categóricos. O teste de normalidade foi realizado para verificar se os valores de idade apresentaram distribuição normal por meio do programa de computador *Minitab*, versão 16. Os resultados foram apresentados em *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e o nível de significância foi estabelecido em 5% com $p \leq 0,05$. O teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) foi avaliada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) com o programa estatístico *BioEstat 5.0*.

Os polimorfismos foram investigados de acordo com os modelos codominante (homozigoto selvagem vs heterozigoto e homozigoto selvagem vs homozigoto polimórfico), dominante (homozigoto selvagem vs heterozigoto + homozigoto polimórfico), recessivo (homozigoto selvagem + heterozigoto vs homozigoto polimórfico), overdominante (homozigoto selvagem + homozigoto polimórfico vs heterozigoto) e aditivo (homozigoto selvagem vs homozigoto polimórfico com peso 2 + heterozigoto), pelo programa *SNPStats* (disponível em: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web>). O programa *SNPStats* também foi usado para avaliar o potencial de interação entre os polimorfismos e hábitos tabagista (ajustado para idade e etilismo) e etilista (ajustado para idade e tabagismo) no risco do carcinoma mamário.

Regressão logística múltipla foi realizada para determinar o efeito das variáveis no risco para o câncer de mama por meio do programa *Minitab*, versão 16. Foram incluídas no

modelo as variáveis: idade (referência: >50 anos; média do grupo total), hábito tabagista (referência: não fumantes), hábito etilista (referência: não etilistas), polimorfismo *CYP1A1*2A* (referência: TT), *CYP1A1*2C* (referência: AA). Também foi avaliada a influência dos polimorfismos nos parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores de mama: tamanho (referência: T1 e T2), comprometimento de linfonodos (referência: N0), metástase (referência: M0), estadiamento (referência: 0, I, IIA e IIB), tipo de carcinoma (referência: *in situ* e papilífero), grau (referência: 0 e I), classificação molecular dos subgrupos (referência: Triplo Negativo) após ajuste para idade, hábitos tabagista e etilista, número de gestações (referência: ≥ 1 gestações), índice de massa corpórea (referência: $<25\text{kg/m}^2$) e terapia hormonal (referência: não fez uso).

Resultados

As frequências dos genótipos para os polimorfismos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo caso (*CYP1A1*2A*: $\chi^2 < 0,01$; $p = 0,98$; *CYP1A1*2C*: $\chi^2 = 1,53$; $p = 0,22$) e grupo controle (*CYP1A1*2A*: $\chi^2 = 0,85$; $p = 0,36$; *CYP1A1*2C*: $\chi^2 = 1,18$; $p = 0,28$).

A Tabela 2 mostra a associação do polimorfismo *CYP1A1*2A* e o risco para o câncer de mama, nos modelos de herança investigados. O polimorfismo *CYP1A1*2C* não foi associado com o câncer de mama ($p > 0,05$). Não foi observada interação dos polimorfismos com os hábitos tabagista ou etilista no risco para câncer de mama (Tabela 3).

A análise de regressão logística modelo mostrou que idade avançada ($p < 0,001$; OR=2,44; IC 95%=1,76-3,39), hábito etilista ($p = 0,030$; OR=1,46; IC 95%= 1,04-2,06) foram associados com o risco do câncer de mama. O resultado desta análise e as

características sociodemográficas das mulheres incluídas no presente estudo estão apresentados na Tabela 4.

As análises de regressão logística dos parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores de mama mostraram que a presença de pelo menos um alelo polimórfico *CYP1A1*2C* (padrão de herança dominante) foi mais frequente em tumores com ausência de metástase à distância ($p=0,007$; $OR=0,18$; $IC\ 95\%=0,05-0,63$) ajustado para idade, hábitos tabagista e etilista, gestações, obesidade e terapia hormonal (Tabela 5). Os polimorfismos não foram associados com os subtipos moleculares do carcinoma de mama (Tabela 6).

Tabela 1. Classificação TNM dos tumores de mama de acordo com a UICC.

Classificação	Característica
Tx	Tumor não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	≤ 2 cm na maior dimensão
T1mic	Microinvasão ≤ 0,1 cm na maior dimensão
T1a	> 0,1 cm até 0,5 cm em sua maior dimensão
T1b	> 0,5 cm até 1 cm em sua maior dimensão
T1c	> 1 cm até 2 cm em sua maior dimensão
T2	> 2 cm até 5 cm em sua maior dimensão
T3	> 5 cm em sua maior dimensão
T4	Qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele
T4a	Extensão à parede torácica
T4b	Edema ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama
T4c	Ambos T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral(ais), móvel(eis)
N2	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente
N2a	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) fixos
N2b	Metástase clinicamente aparente
N3	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) ou clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is) e axilares
N3a	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es)
N3b	Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) e axilares
N3c	Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)
Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Tabela 2. Análise dos modelos de herança dos polimorfismos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* para o risco do carcinoma de mama.

Modelo	Genótipo	Caso N(%)	Controle N(%)	OR ^a (IC 95%)	Valor de p
<i>CYP1A1*2A</i>					
Codominante	T/T	125(57,1)	355(66,6)	1(referência)	
	T/C	81(37)	156(29,3)	1,57(1,11-2,22)	0,028^b
	C/C	13(5,9)	22(4,1)	1,59(0,77-3,30)	
Dominante	T/T	125(57,1)	355(66,6)	1(referência)	
	T/C-C/C	94(42,9)	178(33,4)	1,57(1,13-2,19)	0,0077^b
Recessivo	T/T-T/C	206(94,1)	511(95,9)	1(referência)	
	C/C	13(5,9)	22(4,1)	1,36(0,67-2,80)	0,4
Overdominante	T/T-C/C	138(63)	377(70,7)	1(referência)	
	T/C	81(37)	156(29,3)	1,51(1,08-2,13)	0,018^b
Aditivo	---	---	---	1,41(1,08-1,85)	0,012^b
<i>CYP1A1*2C</i>					
Codominante	T/T	172(78,5)	431(80,9)	1(referência)	
	T/C	42(19,2)	94(17,6)	1,13(0,75-1,71)	0,81
	C/C	5(2,3)	8(1,5)	1,21(0,38-3,86)	
Dominante	T/T	172(78,5)	431(80,9)	1(referência)	
	T/C-C/C	47(21,5)	102(19,1)	1,14(0,76-1,69)	0,53
Recessivo	T/T-T/C	214(97,7)	525(98,5)	1(referência)	
	C/C	5(2,3)	8(1,5)	1,18(0,37-3,76)	0,78
Overdominante	T/T-C/C	177(80,8)	439(82,4)	1(referência)	
	T/C	42(19,2)	94(17,6)	1,13(0,75-1,70)	0,58
Aditivo	---	---	---	1,12(0,79-1,59)	0,52

^a Odds Ratio (OR) ajustado para idade, hábitos tabagista e etilista e polimorfismos no modelo dominante.

^b Valor de p significativo < 0,05.

Tabela 3. Interação entre os polimorfismos *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C*, hábitos tabagista ou etilista no risco para carcinoma de mama.

Variáveis	Genótipo	Caso N(%)	Controle N(%)	OR ^a (IC 95%)	Valor de p
<i>CYP1A1*2A</i>					
Não Tabagista	T/T	84(55,6)	256(67,2)	1,00	0,23
	T/C-C/C	67(44,4)	125(32,8)	1,79(1,21-2,67)	
Tabagista	T/T	41(60,3)	99(65,1)	1,19(0,76-1,88)	0,95
	T/C-C/C	27(39,7)	53(34,9)	1,38(0,80-2,38)	
Não Etilista	T/T	76(57,6)	240(66,1)	1,00	0,95
	T/C-C/C	56(42,4)	123(33,9)	1,56(1,02-2,36)	
Etilista	T/T	49(56,3)	115(67,6)	1,56(1,00-2,42)	0,95
	T/C-C/C	38(43,7)	55(32,4)	2,48(1,49-4,11)	
<i>CYP1A1*2C</i>					
Não Tabagista	T/T	120(79,5)	310(81,4)	1,00	0,89
	T/C-C/C	31(20,5)	71(18,6)	1,12(0,69-1,81)	
Tabagista	T/T	52(76,5)	121(79,6)	0,99(0,66-1,48)	0,18
	T/C-C/C	16(23,5)	31(20,4)	1,18(0,61-2,27)	
Não Etilista	T/T	106(80,3)	288(79,4)	1,00	0,18
	T/C-C/C	26(19,7)	75(20,6)	0,93(0,56-1,54)	
Etilista	T/T	66(75,9)	143(84,2)	1,40(0,95-2,04)	0,18
	T/C-C/C	21(24,1)	27(15,8)	2,27(1,21-4,27)	

^a Odds Ratio (OR) ajustado para idade e hábitos tabagista ou etilista.

Tabela 4. Associação entre os polimorfismos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* e os fatores de risco para carcinoma de mama.

Variáveis	Casos (N=219)	Controles (N=533)	OR^a (IC 95%)	Valor de p
	N (%)	N (%)		
Idade				
<50	85 (38,8)	320 (60)	1 (referência)	
≥50	134 (61,2)	213 (40)	2,44 (1,76 – 3,39)	< 0,001^b
Hábito Tabagista				
Não	151 (69)	381 (71)	1 (referência)	
Sim	68 (31)	152 (29)	0,95 (0,66 – 1,37)	0,788
Hábito Etilista				
Não	132 (60)	363 (68)	1 (referência)	
Sim	87 (40)	170 (32)	1,46 (1,04 – 2,06)	0,030^b

^a *Odds Ratio* (OR) ajustado para idade, hábitos tabagista e etilista e polimorfismos no modelo dominante.

^b Valor de p significativo < 0,05.

Tabela 5. Associação entre os polimorfismos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* e os parâmetros clínico e histopatológicos para o carcinoma de mama.

Características clínicas	N(%)	<i>CYP1A1*2A</i>		<i>CYP1A1*2C</i>	
		OR ^a (IC 95%)	Valor de p	OR ^a (IC 95%)	Valor de p
Tamanho Tumor					
T1 e T2	142(64,8)	1(Referência)		1(Referência)	
T3 e T4	77(35,2)	1,72(0,85-3,50)	0,134	0,81(0,35-1,89)	0,628
Linfonodos					
Não	109(49,8)	1(Referência)		1(Referência)	
Sim	110(50,2)	1,46(0,72-2,96)	0,299	1,02(0,44-2,37)	0,972
Metástase					
Não	172(78,5)	1(Referência)		1(Referência)	
Sim	47(21,5)	1,61(0,73-3,52)	0,236	0,18(0,05-0,63)	0,007^b
Grau					
0 e I	38(17,3)	1(Referência)		1(Referência)	
II e III	181(82,7)	1,18(0,45-3,07)	0,740	0,56(0,19-1,64)	0,293
Estadiamento					
Não agressivo	112(51,1)	1(Referência)		1(Referência)	
Agressivo	107(48,9)	1,20(0,60-2,43)	0,602	0,82(0,35-1,89)	0,635
Quimioterapia					
Não	37(16,9)	1(Referência)		1(Referência)	
Sim	182(83,1)	0,70(0,28-1,73)	0,438	2,01(0,62-6,53)	0,245
Radioterapia					
Não	170(77,6)	1(Referência)		1(Referência)	
Sim	49(22,4)	1,04(0,46-2,34)	0,919	0,62(0,22-1,74)	0,362

^a Odds Ratio (OR) ajustado para idade, hábitos tabagista e etilista e polimorfismos no modelo dominante.

^b Valor de p significativo < 0,05.

Tabela 6. Associação entre os polimorfismos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* e os subtipos moleculares para o carcinoma de mama.

Subtipos moleculares	N(%)	<i>CYP1A1*2A</i>		<i>CYP1A1*2C</i>	
		OR ^a (IC 95%)	Valor de p	OR ^a (IC 95%)	Valor de p
Luminal A					
LumB/HER-2/Triplo/Lum Hib	181(82,6)	1(Referência)		1(Referência)	
Luminal A	38(17,4)	0,85(0,33-2,19)	0,743	1,11(0,36-3,41)	0,858
Luminal B					
LumA/HER-2/Triplo/Lum Hib	113(51,6)	1(Referência)		1(Referência)	
Luminal B	106(48,4)	1,31(0,66-2,59)	0,446	0,86(0,38-1,94)	0,710
HER-2					
LumA/LumB/Triplo/Lum Hib	201(91,8)	1(Referência)		1(Referência)	
HER-2	18(8,2)	2,41(0,77-7,61)	0,133	0,57(0,15-2,24)	0,423
Triplo Negativo					
LumA/LumB/HER-2/Lum Hib	189(86,3)	1(Referência)		1(Referência)	
Triplo Negativo	30(13,7)	0,82(0,30-2,25)	0,694	0,80(0,22-2,91)	0,738
Luminal Híbrido					
LumA/LumB/HER-2/Triplo	192(87,7)	1(Referência)		1(Referência)	
Luminal Híbrido	27(12,3)	0,35(0,09-1,29)	0,114	3,00(0,70-12,78)	0,138

^a Odds Ratio (OR) ajustado para idade, hábitos tabagista e etilista e polimorfismos no modelo dominante.

Discussão

O presente estudo caso-controle avaliou a influência dos polimorfismos *CYP1A1**2A e *CYP1A1**2C e fatores de risco no desenvolvimento de câncer de mama e a associação desses polimorfismos com parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores.

Nossos resultados confirmam os dados da literatura em relação à idade avançada e o hábito etilista como fatores preditores para o câncer de mama. No que se refere à idade avançada, estudos sugerem que polimorfismos no gene *CYP1A1* foram mais frequentes em pacientes acima de 40 anos com câncer de mama.⁽¹⁶⁾

Em relação ao hábito etilista, estudos epidemiológicos abordam a associação do consumo de álcool com o câncer de mama,⁽⁴²⁾ corroborando com nossos achados. As evidências epidemiológicas apontam vários mecanismos para explicar essa associação, como a elevação dos níveis de estrogênio devido ao consumo de álcool,^(42,43) visto que o estrogênio é considerado um fator de risco bem estabelecido para o câncer de mama^(44,45). Além disso, as enzimas que participam do metabolismo do etanol podem atuar na formação de carcinógenos tóxicos que podem causar modificações ao DNA e levar ao desenvolvimento de câncer.^(42,43,46)

As enzimas CYP450 que estão envolvidas no metabolismo do etanol também possuem papel chave no metabolismo de drogas,⁽⁴⁷⁾ outros compostos xenobióticos de origem exógena e de compostos endógenos, tais como ácidos graxos, colesterol, retinóides, eicosanoides, ácido biliar e vitamina D.⁽⁴⁸⁾ Deste modo, são importantes no desenvolvimento de doenças relacionadas a esses compostos mediados pelas CYP450, assim como alterações durante os processos de fertilização, implantação, embriogênese e desenvolvimento neonatal.⁽⁴⁸⁾

A ativação de pró-carcinógenos pela superfamília CYP450 ocorre de diversas maneiras. A família *CYP1A1* atua na formação de epóxido e diol-epóxidos intermediários a partir da oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAPs⁽⁴⁹⁾ e de semiquinonas e quinonas reativos a partir da transformação de estradiol para catecol estrogênios e, subsequentemente, formação de semiquinonas.^(45,50) Esses metabólitos são mutagênicos e podem contribuir para a atividade carcinogênica do estrogênio no desenvolvimento do câncer de mama.⁽⁴⁵⁾

Alterações nos genes codificadores das enzimas CYP450 como polimorfismos genéticos podem influenciar os processos em que essas enzimas atuam.^(15,47) No presente estudo, o polimorfismo *CYP1A1**2A mostrou associação com o câncer de mama em diferentes modelos de herança na população brasileira investigada, mostrando que a presença de pelo menos um alelo polimórfico pode aumentar o risco para o câncer de mama. Nossos achados estão de acordo com recente revisão da literatura^(50,51) realizada em 55.963 casos e 76.631 controles de 268 estudos, a qual avaliou esse polimorfismo em diferentes modelos de herança, e mostrou que o polimorfismo *CYP1A1**2A pode estar associado com o risco aumentado para câncer de mama.

O polimorfismo *CYP1A1**2C não parece desempenhar um papel importante no risco para o câncer de mama no presente estudo, corroborando com os estudos de Amrani e colaboradores (2016)⁽⁵²⁾ com mulheres da Jordânia na Ásia (112 com câncer de mama e 115 sem câncer) e de Petchkovskiy e colaboradores (2014),⁽⁵³⁾ que avaliou mulheres da Rússia (670 mulheres com câncer de mama e 480 sem câncer).

No entanto, os estudos que investigam a associação dos polimorfismos *CYP1A1**2A e *CYP1A1**2C com o câncer de mama têm apontado resultados conflitantes de acordo com a população estudada e o tamanho amostral. Estudos estabeleceram essa

associação^(50,51,54,55) em mulheres mexicanas,⁽⁵⁶⁾ embora outros estudos em mulheres russas,⁽⁵³⁾ asiáticas^(52,57) e caucasianas finlandesas⁽⁵⁸⁾ não evidenciaram relação entre esses polimorfismos no gene *CYP1A1* e o câncer de mama.

O polimorfismo *CYP1A1**2C foi mais frequente em tumores de mama em mulheres com ausência de metástase à distância no presente estudo. O *CYP1A1* é um gene importante da família *CYP450* e os estudos sugerem que polimorfismos *CYP1A1* podem ser fatores de risco para várias doenças malignas, devido ao seu papel na desintoxicação de carcinógenos ambientais e na ativação metabólica de compostos alimentares que protegem contra o câncer.⁽⁵⁹⁾ Deste modo, a contribuição do gene *CYP1A1* para a progressão ou prevenção do câncer depende do equilíbrio entre ativação/detoxificação de carcinógenos e metabolismo extra-hepático de compostos alimentares provenientes da dieta, nos quais atuam as enzimas *CYP1A1*⁽⁵⁹⁾.

No processo de carcinogênese as mutações acumulam-se gradualmente e as células com mutações individuais competem eficazmente com as células normais no interior do tumor por meio da aquisição da capacidade de se transformar, invadir e resistir ao tratamento medicamentoso. Ainda não há dados genômicos suficientes para elucidar os padrões de mutação somática do tumor primário até o tumor metastático e subsequente resistência aos medicamentos⁽⁶⁰⁾. Devido à heterogeneidade individual do tumor, tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e respostas terapêuticas.^(26,27,28)

Portanto, o presente estudo confirma os dados da literatura e associa idade avançada e hábito etilista como fatores de risco estabelecidos para o desenvolvimento de câncer de mama. O polimorfismo *CYP1A1**2A está associado ao risco aumentado para o carcinoma mamário e a presença do polimorfismo *CYP1A1**2C é mais frequente em mulheres com

ausência de metástase à distância. Nossos achados mostram que os polimorfismos no gene *CYP1A1* podem modular o risco para o câncer de mama, bem como do processo de invasão tecidual e metástase à distância, embora estudos futuros com expansão do grupo amostral sejam necessários para melhor compreensão do papel desses polimorfismos na carcinogênese mamária.

Conclusões

Idade avançada (>50 anos) e habito etilista são fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. O polimorfismo *CYP1A1**2A está associado ao risco aumentado para o carcinoma mamário e a presença do polimorfismo *CYP1A1**2C está relacionada à ausência de metástase à distância dos tumores de mama.

Referências

1. Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014*. <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. Acesso 10/09/2016
2. Jemal A, Vineis P, Bray F, et al. *The Cancer Atlas*. 2ª Ed. Atlanta, GA: *American Cancer Society* 2014. www.cancer.org/canceratlas. Acesso 24/07/2016.
3. IARC – International Agency for Research on Cancer 2013 (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer). <http://www.iarc.fr/en/copyright.php>. Acesso 20/11/2015.
4. Inumaru LE, Silveira EA, Naves MMV. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. *Caderno de Saúde Pública* 2011; 27(7):1259-1270.
5. Schneider AP, Zainer CM, Kubat CK, et al. The Breast cancer epidemic: 10 facts. *The Linacre Quarterly* 2014; 81(3) 244-277.
- 6 - Russo, A. Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. [Dissertação] São José do Rio Preto - SP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, 2011.
7. Justenhoven C. Polymorphisms of phase I and phase II enzymes and breast cancer risk. *Front Genet*. 2012; 28; 3-258.
8. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel, R. Xenobiotic – metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man and in human skin models. *Arch Toxicol*. 2014; 88:2135-2190.
9. Pavarino EC, Russo A, Galbiatti ALS, Almeida WP, Goloni Bertollo EM. Glutathione: biosynthesis and mechanism of action. In: Labrou N, Flemetakis E (editores) *Glutathione: biochemistry, mechanisms of action and biotechnological implications*. *Nova Science Publishers Inc*. 2013;7–10.

10. Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, et al. Association between *GSTP1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep.* 2013; 40:4181-8.
11. Vianna-Jorge R, Festa-Vasconcellos JS, Goulart-Citrangulo SMJ, et al. Functional polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes and their impact on the therapy of breast cancer. *Front Genetics* 2013; 3:329.
12. The Human Cytochrome P450 (*CYP*) Allele Nomenclature Database (Nomenclatura e Base de dados do Citocromo P450(*CYP*)). <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>. Acesso 12/04/2016
13. Long JR, Cai Q, Shu XO, et al. Genetic polymorphisms in estrogen-metabolizing genes and breast cancer survival. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17(5):331-8.
14. Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2010; 433-4.
15. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, et al. Polymorphisms of the *CYP1A1* and *CYP2E1* genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(2):1055-63.
16. Ociepa-Zawal M, Rubiś B, Filas V, Breborowicz J, Trzeciak WH. Studies on *CYP1A1*, *CYP1B1* and *CYP3A4* gene polymorphisms in breast cancer patients. *Ginekol Pol.* 2009; 80(11):819-23.
17. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, et al. Meta and pooled analyses of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *CYP1A1* genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12:1509-17.
18. Cha IH, Park JY, Chung WY, Choi MA, Kim HJ, Park KK. Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Med Journal* 2007; 48:233-9.

19. Singh AP, Shah PP, Mathur N, Buters JT, Pant MC, Parmar D. Genetic polymorphisms in cytochrome P4501B1 and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res.* 2009; 639(1-2):11-9.
20. Tai J, Yang M, Ni X, et al. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 genes are associated with an increased risk of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010; 196(1):76-82.
21. Houlston RS. CYP1A1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Pharmacogenetics* 2000; 10(2):105-114.
22. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, et al. CYP1A1, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol Oncol.* 2001; 81:263-269.
23. Sam SS, Thomas V, Reddy SK, Surianarayanan G, Chandrasekaran A. CYP1A1 polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *Head Neck* 2008; 30(12):1566-74.
24. Carpenter CL, Morgenstern H, London SJ. Alcoholic beverage consumption and lung cancer risk among residents of Los Angeles County. *Journal Nutr.* 1998; 128:694-700.
25. União Internacional Contra o Câncer (UICC) - TNM: classificação de tumores malignos. Instituto Nacional de Câncer. Traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6^a ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.
26. Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2015. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso 20/11/2015.
27. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. Molecular subtypes of breast câncer. *Femina* 2011; 39:10.

28. Sikandar B, Qureshi MA, Mirza T, Khan S, Avesi L. Differential immune cell densities in ductal carcinoma in-situ and invasive breast cancer: Possible role of leukocytes in early stages of carcinogenesis. *Pak J Med Sci* 2015; 31:274-279.
29. Gobbi, H. Classification of tumours of the breast: an update based on the new world health organization classification. *J Bras Patol Med Lab.* 2012; 48(6):463-474.
30. Naushad SM, Pavani A, Rupasree Y, et al. Association of Aberrations in One-Carbon Metabolism With Molecular Phenotype and Grade of Breast Cancer. *Mol Carcinog* 2012; 51 Suppl 1:E32-41.
31. Ortiz AP, Frías O, Pérez J, et al. Breast cancer molecular subtypes and survival in a hospital-based sample in Puerto Rico. *Cancer Medicine* 2013; 2(3):343–350.
32. Perou CM, Borresen-Dale, A. Systems Biology and Genomics of Breast Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2011; 3(2).
33. Bernardi MA, Logullo FA, Pasini FS, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol Rep* 2012; 27(1):28-38.
34. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, et al. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *J Thorac Disease* 2013; 5(1):S2-S8.
35. Hvidtfeldt UA, Tjønneland A, Keiding N, et al. Risk of breast cancer in relation to combined effects of hormone therapy, body mass index and alcohol use, by hormone-receptor status. *Epidemiology* 2015; 26:353–361.
36. Connor AE, Baumgartner RN, Pinkston C, Baumgartner KB. Obesity and Risk of Breast Cancer Mortality in Hispanic and Non-Hispanic White Women: The New Mexico Women's Health Study. *J Womens Health (Larchmt)* 2013; 22(4):368-377.
37. James FR, Wootton S, Jackson A, Wiseman M, Copson ER, Cutress RI. Obesity in breast cancer – What is the risk factor? *EJC* 2015; 51:705-720.

-
38. Clavel-Chapelon F, Gerber M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? *Breast Cancer Res Treat.* 2002;72:107-15.
39. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, et al. Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Association Consortium Studies. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(3):250-63.
40. Miller SA, Dikes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
41. Arvanitis DA, Goumenou AG, Matalliotaski IM, Koumantaski EE, Spandidos DA. Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;76(6):1202-6.
42. Coronado GD, Beasley J, Livaudais J. Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *Salud Publica Mex.* 2011;53(5):440-7.
43. Shield KD, Soerjomataram I, Rehm J. Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(6):1166-81.
44. Tworoger SS, Zhang X, Eliassen AH, et al. Inclusion of endogenous hormone levels in risk prediction models of postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32:3111-7.
45. Fussell KC, Udasin RG, Smith PJ, Gallo MA, Laskin JD. Catechol metabolites of endogenous estrogens induce redox cycling and generate reactive oxygen species in breast epithelial cells. *Carcinogenesis* 2011;32(8):1285-93.
46. Henkler F, Stolpmann K, Luch A. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *EXS.* 2012;101:107-31.
47. Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiess A, Preissner S. Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS One* 2013;8(12).

-
48. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1612)
49. Hodek P, Koblihová J, Kizek R, et al. The relationship between DNA adduct formation by benzo[a]pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36(3): 989-96.
50. He X, Feng S. Role of Metabolic Enzymes P450 (CYP) on Activating Procarcinogen and their Polymorphisms on the Risk of Cancers. *Curr Drug Metab.* 2015;16(10):850-63.
51. He XF, Wei W, Liu ZZ, et al. Association between the CYP1A1 T3801C polymorphism and risk of cancer: evidence from 268 case-control studies. *Gene.* 2014; 25;534(2):324-44.
52. Amrani I, Bulatova N, Awidi A, et al. Lack of Association between CYP1A1 M2 and M4 Polymorphisms and Breast Carcinoma in Jordanian Women: a Case-Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(1):387-93.
53. Petchkovskiy EV, Shadrina AS, Boyarskih UA, et al. The polymorphism of genes of synthesis and metabolism of estrogens and the risk of breast cancer. *Klin Lab Diagn.* 2014;(2):19-23.
54. Surekha D, Sailaja K, Rao DN, Padma T, Raghunadharao D, Vishnupriya S. Association of *CYP1A1**2 polymorphisms with breast cancer risk: a case control study. *Indian J Med Sci.* 2009;63(1):13-20.
55. Saadatian H, Gharesouran J, Montazeri V, Mohammadi SA, Mohaddes Ardabili SM. Polymorphism of the cytochrome P-450 1A1 (A2455G) in women with breast cancer in Eastern Azerbaijan, Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(3):227-230.
56. Martinez-Ramirez OC, Perez-Morales R, Castro C, et al. Polymorphisms of catechol estrogens metabolism pathway genes and breast cancer risk in Mexican women. *Breast* 2013;22(3):335-43.

57. Kiruthiga PV, Kannan MR, Saraswathi C, et al. CYP1A1 gene polymorphisms: lack of association with breast cancer susceptibility in the southern region (Madurai) of India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(8):2133-8.
58. Sillanpaa P, Heikinheimo L, Kataja V, et al. CYP1A1 and CYP1B1 genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish Caucasian population. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;104(3): 287-97.
59. Wu B, Liu K, Huang H, et al. *Msp*I and Ile462Val polymorphisms in CYP1A1 and overall cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(12).
60. Gonçalves R, Warner WA, Luo J, Ellis MJ. New concepts in breast cancer genomics and genetics. *Breast Cancer Res*. 2014;16(5):460.

3. Conclusões

3. Conclusões

1. Os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1A1*2C* não apresentam associação com o desenvolvimento do câncer de mama; Mulheres portadoras de pelo menos um alelo polimórfico *CYP1A1*2A* apresentam maior risco para o câncer de mama;
2. Mulheres com idade avançada e que ingerem bebida alcoólica apresentam risco aumentado para desenvolver câncer de mama;
3. Não há evidência de interação entre os polimorfismos estudados e os fatores de risco no desenvolvimento de tumores de mama;
4. A presença do polimorfismo *CYP1A1*2C* está relacionada à ausência de metástase à distância dos tumores de mama.

4. Referências Bibliográficas

4. Referências Bibliográficas

1. Kumar V *et al.* Patologia: Bases patológicas das doenças. 7ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier 2006; 282.
2. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: the next generation. Cell 144. Elsevier, 2011.
3. Nalejska E, Maczynska E, Lewandwska MA. Prognostic and predictive Biomarkers: tools in personalized oncology. Mol Diag Therapy 2014;18(3):273-284.
4. Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2015; <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>.
5. NIH – *National Health Institute* (Instituto Nacional da Saúde) 2015; <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer/statistics>.
6. IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) 2015; <http://www.iarc.fr/en/copyright.php>.
7. Jemal ADV, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clinical 2011; 61:69-90.
8. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base nº10. GLOBOCON 2008. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010.
9. Lee BL, Liedke PER, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast Cancer in Brazil: present status and future goals. Lancet Oncol. 2012; 13(3):95-102.
10. AC Camargo Cancer Center 2015; <http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer/mama/27/>.
11. Justenhoven C. Polymorphisms of phase I and phase II enzymes and breast cancer risk. Front Genet. 2012; 28:3-258.

12. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004;40(18):2667-75.
13. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(4):276–285.
14. Adami H, Hunter D, Trichopoulos D. Text book of Cancer Epidemiology. 2ª edição: Oxford University Press, 2008.
15. Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated mod breast cancer etiology. The lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res*. 2004;6:213-218.
16. Umitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk-where do we stand in. *J. Cell Mol. Med*. 2005;9(1):208-221.
17. Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, Evans DG, Garcia-Closas M, *et al*. Risk determination and prevention of Breast Cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(5):446.
18. Sasco AJ. Breast cancer and the environment. *Horm Res*. 2003;60(3):50.
19. Sohail A, Kanwal N, Ali M, Sadia S, Masood AI, Ali F, *et al*. Effects of Glutathione-S-transferase polymorphisms on the risk of breast câncer: a population-based case-control study in Pakistan. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;35(2):143-153.
20. Wei L, Li ZX, Peng T, Yang H, Feng ZB, Wei KL, *et al*. Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasonography in different pathological types and differentiated grades of primary liver carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2012;20(12):939-41.
21. American Cancer Society – ACS; 2015. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/index>.
22. União Internacional Contra o Câncer (UICC) - TNM: classificação de tumores malignos. Instituto Nacional de Câncer. Traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6ª edição - Rio de Janeiro: INCA 2004; 254.

23. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. Molecular subtypes of breast câncer. *FEMINA* 2011;39(10):1-5.
24. Sikandar B, Qureshi MA, Mirza T, Khan S, Avesi L. Differential immune cell densities in ductal carcinoma In-Situ and invasive breast cancer: Possible role of leukocytes in early stages of carcinogenesis. *Pak J Med Sci.* 2015;31(2):274-279.
25. Gobbi H. Classification of tumours of the breast: an update based on the new world health organization classification. *J Bras Patol Med Lab.* 2012;48(6):463-474.
26. Naushad SM, Pavani A, Rupasree Y, Divyya S, Deepti S, Digumarti RR, *et al.* Association of Aberrations in One-Carbon Metabolism With Molecular Phenotype and Grade of Breast Cancer. *Mol Carcinog.* 2012;51(1):32-41.
27. Ortiz AP, Frías O, Pérez J, Cabanillas F, Martínez L, Sánchez C, *et al.* Breast cancer molecular subtypes and survival in a hospital-based sample in Puerto Rico. *Cancer Med.* 2013;2(3):343–350.
28. Perou CM, Borresen-Dale, A. Systems Biology and Genomics of Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(2):1-17.
29. Bernardi MA, Logullo FA, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, *et al.* Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncology reports.* 2012; 27(1):28-38.
30. Long JR, Cai Q, Shu XO, Cai H, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in estrogen-metabolizing genes and breast cancer survival. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17(5):331-8.
31. Shimada N, Iwasaki M, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, *et al.* Genetic polymorphisms in estrogen metabolism and breast câncer risk in case-control studies in Japanese, Japanese brazilian and non Japanese Brazilians. *Journal Human Genetic* 2009; 54(4):209-215.

32. Tserga A, Michalopoulos NV, Levidou G, Korkolopoulou P, Zografos G, Patsouris E, *et al.* Association of aberrant DNA methylation with clinico pathological features in breast cancer. *Oncol Rep.* 2012;27(5):1630-8.
33. Abbas A, Delvinquiére K, Lechevreilm M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, *et al.* *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility esophageal cancer in French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004;10(23):3389-93.
34. Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE, *et al.* Polymorphisms of *GSTT1* and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck.* 2004;26(1):63-70.
35. Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, Shih YH, Chang KW, *et al.* Association of GST genotypes with age of on set and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(8):473-7.
36. Ho T, Wei Q, Sturgis EM. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2007;29(7):682-99.
37. Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, *et al.* Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutation Research* 2008;638:184-194.
38. Sumathi B, Ramalingam S, Navaneethan U, Jayanthi V. Risk factors for gastric cancer in South India. *Singapore Med J.* 2009;50(2):147-51.
39. Jemal A, Vineis P, Bray F, Torre L, Forman D, Aggarwal A, *et al.* The Cancer Atlas. 2ª edição. Atlanta, GA: American Cancer Society 2014. Disponível: www.cancer.org/canceratlas.
40. Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Donesh J. Five Glutathione transferase gene variant in 23. 452 cases of lung cancer and 30.397 controls: meta-analysis of 130 studies. *Plos Med* 2006;3(4):91.

41. Zheng T, Holford TR, Zhahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, *et al.* Cigarette smoking glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2002;13(7):637-45.
42. Colombo J e Rahal P. Alterações genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2009;55(2):165-174.
43. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.
44. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, *et al.* Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1055-63.
45. Russo, A. Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. (Dissertação) São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2011.
46. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18(4):641-644.
47. Lavender NA, Benford ML, VanCleave TT, Brock GN, Kittles RA, Moore JH, *et al.* Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and prostate cancer risk among Men of African Descent: A case-control study. *BMC Cancer* 2009;9:397.
48. Ada AO, Kunak CS, Hancer F, Bilgen S, Suzen SH, Alpar S, *et al.* CYP and GST polymorphisms and survival in advanced non-small cell lung cancer patients. *Neoplasma* 2010;57(6):512-21.

49. Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A, *et al.* *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. *Cancer Lett.* 2006;242(1):60-67.
50. Li D, Dandara C, Parker MI. The 341C/T polymorphism in the *GSTP1* gene is associated with increase risk of esophageal cancer. *BMC Genetics.* 2010;11:47.
51. Wang B, Huang G, Wang D, Li A, Xu Z, Dong R, *et al.* Null genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *J Hepatol.* 2010;53(3):508-18.
52. Economopoulos KP, Sergentanis TN. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTA1* and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2010;46(9):1617-31.
53. Biselli JM, de Angelo Calsaverini Leal RC, Ruiz MT, Goloni-Bertollo EM, Maníglia JV, Rossit ARB, *et al.* *GSTT1* and *GSTM1* polymorphism in cigarette smokers with head and neck squamous cell carcinoma. *Brazilian Journal Otorhinolaryngol.* 2006;72(5):654-8.
54. Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Corrêa LC, Maníglia JV, Rossit AR, Ruiz MT, *et al.* Evaluation of the influence of *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes in head and neck carcinogenesis. *Rev Associação Médica Brasileira* 2006;52(5):365-8.
55. Soya SS, Vinod T, Reddy KS, Gopalakrishnan S, Adithan C. Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and upper aerodigestive tract cancer risk among smokers, tobacco chewers and alcoholics in a Indian population. *Europe J Cancer* 2007;43(18):2698-2706.
56. Varela-Lema L, Taioli E, Ruano-Ravina A, Barros-Dios JM, Anantharaman D, Benhamou S, *et al.* Meta-analysis and pooled analysis of *GSTM1* and *CYP1A1* polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC. *Genet Med.* 2008;10(6):369-384.

-
57. Zafereo ME, Sturgis EM, Aleem S, Chaung K, Wei Q, Li G, *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of second primary malignancy after index squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Prev Res.* 2009;2(5):432-439.
58. Sam SS, Vinod Thomas KS, Reddy J. Gene-environment interactions associated with CYP1A1 *MspI* and GST polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(6):945-951.
59. Leme CV, Raposo LS, Ruiz MT, Biselli JM, Galbiatti AL, Maniglia JV, *et al.* *GSTM1* and *GSTT1* genes analysis in head and neck cancer patients. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(3):299-303.
60. Kasapović J, Pejic S, Todorovic A, Stojiljkovic V, Pajovic SB. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem Funct.* 2008;26(6):723-730.
61. Kaushal M, Mishra AK, Raju BS, Ihsan R, Chakraborty A, Sharma J, *et al.* Betel quid chewing as an environmental risk factor for breast cancer. *Mutat Res.* 2010;703(2):143-8.
62. Jardim BV, Moschetta MG, Gelaleti GB, Leonel C, Regiani VR, de Santi Neto D, *et al.* Glutathione transferase pi (GSTpi) expression in breast cancer: An immunohistochemical and molecular study. *Acta Histochem.* 2012; 114(5):510-7.
63. Duggan C, Ballard-Barbash R, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Bernstein L, Mctiernan A. Associations between null mutations in *GSTT1* and *GSTM1*, the *GSTP1* Ile105Val polymorphism, and mortality in breast cancer survivors. *SpringerPlus.* 2013; 2:450.
64. Khabaz MN. Polymorphism of the glutathione S-transferase P1 gene (GST -pi) in breast carcinoma. *Pol J Pathol.* 2014;65(2):141-6.

65. Zhang SX, Yun L, Yan LG, Jia GL. *GSTT1* polymorphism and breast cancer risk in the Chinese population: an updated meta-analysis and review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):6650-6657.
66. Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, *et al*. Polymorphisms in glutathione S-transferases (*GSTM1* and *GSTT1*) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res*. 2001;61(19):7130-7135.
67. Chacko P, Josepha T, Mathewb BS, Rajanb B, Radhakrishna M P. Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome. *Mutation Research*. 2004;581:153-163.
68. Naushad SM, Pavani A, Digumarti RR, Gottumukkala SR, Kutala VK. Epistatic interactions between loci of one-carbon metabolism modulate susceptibility to breast cancer. *Molecular Biology Rep*. 2011;38(8):4893-4901.
69. Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld Granadeiro LA. Positive Association of Polymorphisms in Estrogen Biosynthesis Gene, CYP19A1, and Metabolism, GST, in Breast Cancer Susceptibility. *DNA Cell Biol*. 2012;31(6):1100-6.
70. The Human Cytochrome P450 (*CYP*) Allele Nomenclature Database (Nomenclatura e Base de dados do Citocromo P450(*CYP*)). <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>. Acesso 12/04/2016.
71. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo - CONTAPP. "Falando sobre Câncer e seus Fatores de Risco". <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude>.
72. Geyer FC, Nigro MV. Tipos histológicos especiais de câncer de mama. *Onco &* 2013:1-5.
73. Cha IH, Park JY, Chung WY, Choi MA, Kim HJ, Park KK. Polymorphisms of CYP1A1 and *GSTM1* genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Med J*. 2007;48(2):233-239.

74. Houlston RS. CYP1A1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Pharmacogenetics* 2000;10(2):105-114.
75. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Bertram CC, Wilkens LR, Guo C, *et al.* *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol Oncol.* 2001;81(2):263-269.
76. Sam SS, Thomas V, Reddy SK, Surianarayanan G, Chandrasekaran A. CYP1A1 polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *Head Neck.* 2008;30(12):1566-1574.
77. Singh AP, Shah PP, Mathur N, Buters JT, Pant MC, Parmar D. Genetic polymorphisms in cytochrome P4501B1 and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res.* 2008;639(1-2):11-9.
78. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisey R, Cascorbi I, Lazarus P, *et al.* Meta-and pooled analyses of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(12):1509-17.
79. Tai J, Yang M, Ni X, Yu D, Fang J, Tan W, *et al.* Genetic polymorphisms in cytochrome P450 genes are associated with an increased risk of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;196(1):76-82.
80. Seigard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect.* 1997;105(4):791-799.
81. Alvarenga LM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of northwestern São Paulo. *Rev. Bras. Otorrino Laringol.* 2008; 74:68-73.
82. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, *et al.* Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(2):1055-63.

83. Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, et al. Association between *GSTP1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep.* 2013; 40:4181-8.
84. Pavarino EC, Russo A, Galbiatti ALS, Almeida WP, Goloni Bertollo EM. Glutathione: biosynthesis and mechanism of action. In: Labrou N, Flemetakis E (editores) Glutathione: biochemistry, mechanisms of action and biotechnological implications. *Nova Science Publishers Inc.* 2013;7–10.

5. Apêndices

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: Avaliação de marcadores moleculares e clínicos em câncer de mama

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo - UPGEM: Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular da FAMERP;

Este estudo tem como objetivos: 1) Coletar informações da história e obter dados clínicos dos prontuários médicos dos pacientes com câncer de mama atendidos no Serviço de Atendimento Ambulatorial vinculado ao Departamento de Ginecologia e Obstetria/Mastologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto. 2) Analisar alterações em genes (material hereditário) com a finalidade de esclarecer o papel de fatores genéticos no desenvolvimento do tumor;

Para este estudo serão utilizados dois grupos de pessoas: 1) pacientes com câncer de mama; 2) indivíduos do grupo controle, não portadores do tumor;

O estudo será feito utilizando-se sangue, que será colhido com seringa descartável por enfermeira e o risco da colheita pode incluir inchaço e vermelhidão no local, sem qualquer outro risco para minha saúde;

O material (sangue) será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e identidade serão preservadas;

O material genético (DNA), ou seja hereditário, extraído do sangue será armazenado no laboratório, compondo um banco de amostras biológicas, podendo ser utilizado em futuros estudos;

Todas as informações por mim fornecidas por meio do questionário e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas;

Se eu concordar em participar desta pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso do meu sangue, do modo descrito acima, não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, em doar o sangue para a pesquisa ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento;

Esse estudo é importante porque pode colaborar para conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional:

Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo – Departamento de Biologia Molecular

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto

São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000 Fone: (17) 3201-5720 e-mail: eny.goloni@famerp.br

Apêndice 2 – Questionário Padronizado**QUESTIONÁRIO CASO****CMS**

Dados Gerais:

Nome: _____

Prontuário: _____ Telefone: _____

Data de Nascimento e Local: _____

Endereço: _____ Nº _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Etnia: _____ Profissão: _____ Escolaridade: _____

Data da coleta: _____

HISTÓRICO MÉDICO

Fatores de risco:

Exposição ao Álcool: () Sim () Não - Duração: _____

Exposição ao Tabaco: () Sim () Não () Ex-fumante - Duração: _____

Casos na família e Local: _____

Peso: _____ Altura: _____

Terapia Hormonal: Anticoncepcional: () Sim () Não Outros: _____

Número de Gestações: _____ Filhos Vivos: _____ Abortos: _____ Natimorto: _____

Diabetes: () Sim () Não Hipertensão: () Sim () Não Outras: _____

Dados do Tumor:

Diagnostico: () Imagem () Biopsia Tipo: _____

Tratamento recebido:

Quimioterapia: () Sim () Não Radioterapia: () Sim () Não

Cirurgia: () Sim () Não Qual: _____

Linfonodo: () Sim () Não

Metástase: () Sim () Não Local: _____

Responsável pela entrevista: _____