

Leili Daiane Hausmann

**POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO
GENE *HLA-G* EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA DE
SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora:

Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz

Coorientadora:

Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hausmann, Leili Daiane

POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO GENE HLA-G
EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA DE SANTA CATARINA / Leili
Daiane Hausmann ; orientadora, Yara Costa Netto Muniz ;
coorientadora, Iliada Rainha de Souza. - Florianópolis, SC,
2016.

139 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

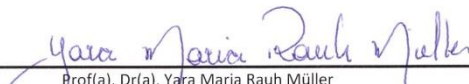
1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Doenças. 3.
Câncer de mama. 4. Genética. 5. Sistema imunológico. I.
Muniz, Yara Costa Netto. II. de Souza, Iliada Rainha. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV.
Título.

**"Poliformismos da região 3' não traduzida do gene HLA-G em mulheres com
câncer de mama de Santa Catarina"**


Por

Leili Daiane Hausmann

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (003/PPGBCD/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.


Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Müller
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:


Dr(a) Yara Costa Netto Muniz (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr(a) Renata Toscano Simões (Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa Belo Horizonte)


Dr(a) Andrea Rita Marrero (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Patricia Dillenburger Pilla (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina onde realizei meu curso de graduação em Ciências Biológicas e o mestrado.

Aos órgãos de fomento, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo financiamento de minha bolsa de estudo de mestrado e pelos financiamentos dos projetos de pesquisa desenvolvidos no LAPOGE (Laboratório de Polimorfismos Genéticos), um dos quais resultou nessa dissertação.

À minha orientadora, Dra. Yara Costa Netto Muniz pela confiança no meu trabalho, pelas lições de vida e de profissionalismo e principalmente pela amizade. Por procurar sempre fazer com que o ambiente de trabalho seja agradável e produtivo, pelas risadas, boas vibrações e pensamentos positivos. Tenho muito orgulho de você e vibro com cada conquista sua.

À minha coorientadora professora Dra. Ilíada Rainha de Souza, pela oportunidade de crescimento e aprendizado a cada conversa durante os últimos 6 anos. Por cultivar valores que vão além dos conhecimentos científicos.

Às mulheres participantes do estudo que, além de contribuírem com a realização da pesquisa, tornaram-se uma inspiração para a vida.

Aos indivíduos e instituições envolvidos na pesquisa, aos funcionários do Hospital Universitário, principalmente aos médicos, Braulio Leal Fernandes e Renato Salerno Wilkens, pelo auxílio no contato com as mulheres com câncer de mama e pela dedicação para que estes aceitassem participar do estudo.

À banca avaliadora, Dra. Renata Toscano Simões, Dra. Andrea Rita Marrero, Dra. Patricia Dillenburg Pilla e Dra. Sara Emelie Löfgren, que gentilmente aceitaram o convite e prontamente se dispuseram a avaliar e contribuir com esse trabalho.

Aos colegas do LAPOGE por auxiliarem de alguma forma na elaboração do trabalho com o ensino das técnicas, coletas de amostras, extrações de DNA e por contribuírem para minha formação profissional e pessoal. À Dra. Sandra Regina Rachadel Torres por sua amizade e conselhos tanto para a vida profissional quanto pessoal. À Ma. Bibiana Sgorla de Almeida por toda a paciência, pelas dicas, pela força e pela

amizade. Uma pessoa que me estimula a questionar e a aprender, em quem me espelho a cada dia. Às colegas que me ensinaram tudo que eu sei no laboratório, Cíntia, Ticianá, Mariáh, Patrícia, Maria Luiza, meu obrigada por toda a paciência e pela amizade. Às queridas Clisten e Mari por todo o carinho de sempre, por sempre estarem disponíveis para ajudar quem precisa, por pensarem no bem coletivo e pela amizade.

Às “xuxus” da graduação, May, Mille, Rafi, Chê, Amanda e Gabi pelos ótimos momentos que passamos juntas, pela amizade e pelos momentos de descontração. Gabi obrigada pela parceria de laboratório de sempre, pelas brigas, pelas risadas, cafés, pantaninhos e pela amizade.

Aos meus amigos do USJ, Dalvinha, Carme, Meire, Ale e Fabrício que me apoiaram muito nos últimos anos e que “administraram” meus dias com muita alegria.

Aos meus pais, Marlene e Wilmar, pelo amor e dedicação imensuráveis, pelo esforço e apoio para que eu sempre pudesse me dedicar aos estudos. Ao David pelo amor, brigas e amizade. Ao Lucas pelo companheirismo de sempre. A toda família pelo enorme carinho.

RESUMO

O câncer de mama desenvolve-se no tecido mamário, é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais frequente entre as mulheres. O câncer de mama é considerado uma doença multifatorial que, resulta de interações entre fatores genéticos, imunológicos, ambientais, comportamentais, hormonais e reprodutivos. Com relação ao sistema imune, a expressão de *HLA-G* está relacionada ao escape da imunovigilância em diversos tumores e sua expressão pode ser influenciada por polimorfismos, principalmente na 3'UTR. O *HLA-G* possui na 3'UTR dez sítios polimórficos mais estudados: o polimorfismo *14 pb In/Del* e nove SNP (+3001 T/C, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G, +3196 G/C e +3227 A/G). A partir disso, o objetivo do estudo foi estudar polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* em 193 mulheres com câncer de mama e em 193 mulheres sem evidência de câncer de mama, visando compreender a ação deste gene no desenvolvimento da doença. Para isso, foi realizado um levantamento de dados epidemiológicos e estes foram testados como fatores de risco. Os dados clínicos Grau de Elston-Ellis e TNM foram obtidos através de prontuários médicos. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por PCR e visualizada em PAGE 7%, no qual o polimorfismo *14 pb In/Del* foi identificado, e por sequenciamento para os outros nove SNP. Após as análises as associações encontradas foram: genótipos AA +3187 como risco para o desenvolvimento do câncer de mama (OR = 1,605) e AG + 3187 como fator de proteção (OR=0,610); associação de proteção para a combinação haplotípica UTR-1 + UTR-3 (OR = 0,320). Com relação ao dado clínico Grau de Elston-Ellis houve associação de risco quando comparados os grupos III e I para os genótipos heterozigotos dos polimorfismos +3010 G/C e +3142 G/C (OR= 4,063 e OR= 3,813, respectivamente). Com relação aos dados epidemiológicos, menopausa (<50 anos) foi relacionada como fator de proteção (OR = 0,467) e a menopausa tardia foi relacionada como fator de risco (OR = 2,142). A utilização de anticoncepcional por 5 anos ou mais foi relacionada como fator de risco (OR = 1,560) e a não utilização foi relacionada como fator de proteção (OR = 0,641). Em conclusão, os polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* são associados à doença bem como aos dados epidemiológicos analisados neste trabalho.

Palavras-chave: HLA. 3'UTR. Carcinoma mamário. Fator de risco.

ABSTRACT

Breast cancer is abnormal cell growth in mammary tissue, is the second most frequent type of cancer worldwide, moreover the most frequent type that affects women. It is considered to be a multifactorial disease that results from the interaction of genetic, immunological, environmental, behavioral, hormonal and reproductive factors. Regarding immunological factors, differential expression of the *HLA-G* has already been reported as capable to influence cancer ability to evade immune surveillance. *HLA-G* expression is influenced by the presence of polymorphisms, especially those in the 3'UTR. Ten polymorphic sites are currently well studied, the polymorphism *14 pb In/Del* and other nine SNP, i.e. +3001 T/C, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G, +3196 G/C e +3227 A/G. Thus the aim of this study was to analyze the presence of these ten polymorphisms in the 3'UTR of the gene *HLA-G* in a population of 193 women with and 193 without breast cancer, in order to better understand the effect of this gene on this illness. For that, epidemiological data regarding exposure to possible risk factors were collected, also clinical variables, as Elston-Ellis and TNM scores, were gathered from medical records. The DNA was extracted from whole blood and genotyping was made by PCR and visualized on PAGE 7 %, in which the *14 bp In/Del* polymorphism was identified and by sequencing of the nine other SNP. After analysis, the genotype *AA +3187* was associated as a risk factor (OR = 1,605), and *AG + 3187* (OR=0,610), as well as the haplotype UTR-1 + UTR-3 (OR = 0,320) as protective factors for developing breast cancer. Besides that, we found a risk association between the scores III and I in the Elston-Ellis scale and the heterozygotic genotypes +3010 G/C e +3142 G/C (OR= 4,063 e OR= 3,813, respectively). Regarding the epidemiological data, menopause (<50 years) was a protective factor (OR = 0,467) while late menopause was a risk factor (OR = 2,142). Usage of hormonal contraceptives for 5 or more years was identified as a risk factor (OR = 1,560; $p = 0,059$), as well as the non-usage as a protective factor (OR = 0,641; $p = 0,059$). Concluding, the polymorphisms in the 3'UTR of the gene *HLA-G* were associated to the illness along with the epidemiological data.

Keywords: HLA. 3'UTR. Mammary carcinoma. Risk factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas dos números de novos casos de cânceres em mulheres, no Brasil, para o ano de 2016, discriminados conforme sua localização primária.	22
Figura 2 - Representação esquemática da composição de uma mama normal com vista frontal e lateral.	23
Figura 3 - Representação esquemática do MHC Humano. A localização da região do MHC humano no cromossomo 6 (6p21.3), a disposição de alguns genes dentro das classes II, III e I e em amarelo, destaque para a região estudada nesse trabalho, onde localiza-se o gene <i>HLA-G</i>	28
Figura 4 - Representação esquemática do gene <i>HLA-G</i> e seus transcritos.	31
Figura 5 - Representação esquemática das sete isoformas proteicas do <i>HLA-G</i> geradas por processamento alternativo, sendo quatro ligadas à membrana plasmática e três solúveis.	32
Figura 6 - Sequência de nucleotídeos da 3'UTR do gene <i>HLA-G</i> , onde estão identificados 10 sítios de variações polimórficas considerados no presente estudo (destacados com retângulo vermelho).	35
Figura 7 - Fotografia de gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. O gel ilustra bandas relativas à amplificação de um fragmento da 3'UTR do <i>HLA-G</i> que apresentam diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA devido ao polimorfismo <i>14 pb In/Del</i> . A coluna 1 representa um indivíduo com genótipo <i>InIn</i> ; a 2 um indivíduo com genótipo <i>DelDel</i> ; e a coluna 3 representa um indivíduo heterozigoto <i>InDel</i>	49
Figura 8 - Cromatografia resultante do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Na ilustração, temos a sequência de bases nitrogenadas onde estão localizados os SNP +3187 (R) e +3196 (S). Para o primeiro SNP (R), o indivíduo em questão é heterozigoto (<i>AG</i> , cores verde e preta, respectivamente) enquanto que, para o segundo SNP (S) o indivíduo é homozigoto (<i>CC</i> , cor azul).	51
Figura 9 - Alguns miRNA que podem influenciar a expressão do gene <i>HLA-G</i> ilustrados. Em destaque os três miRNA que se ligam ao polimorfismo +3142 <i>G/C</i>	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da amostra, de acordo com a idade, faixa etária e ancestralidade, de mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres sem a doença (controles).....	57
Tabela 2 - Frequências alélicas e genótípicas para os grupos casos e controles e valor de p para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) estimadas para os 10 sítios de variações polimórficas considerados no presente estudo.....	60
Tabela 3 - Diferenciação gênica e genotípica baseadas nos 10 <i>loci</i> estudados.....	65
Tabela 4 - Cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos para cada <i>locus</i> averiguado e o desenvolvimento do câncer de mama, com seus respectivos valores de intervalo de confiança (CI 95 %) e de p	66
Tabela 5 - Cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos do gene <i>HLA-G</i> com modelos de herança e o desenvolvimento do câncer de mama, valores de intervalo de confiança (CI 95 %) e de p para OR.....	72
Tabela 6 - Classificação epidemiológica da amostra, do grupo casos e do grupo controles e análise de OR para susceptibilidade ao câncer de mama, com seus respectivos valores de CI e p	78
Tabela 7 - Análises de associação (OR), com seus respectivos valores de CI e p , entre o estágio III <i>versus</i> os estágios I e II em mulheres com câncer de mama para os polimorfismos <i>14 pb</i> e <i>+3142</i> da 3'UTR do gene <i>HLA-G</i>	79
Tabela 8 - Frequências do dado clínico Grau de Elston e Ellis analisadas em mulheres com câncer de mama.....	80
Tabela 9 - Análises de associação (OR) e seus valores de CI e p , entre os 3 tipos de Grau de Elston e Ellis (Grau I, Grau II e Grau III) em mulheres com câncer de mama para cada polimorfismo da 3'UTR do gene <i>HLA-G</i>	81
Tabela 10 - Probabilidade (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os dez sítios polimórficos detectados nos grupos casos e controles ($p \leq 0,05$).....	92
Tabela 11 - Haplótipos inferidos para 3'UTR do <i>HLA-G</i> , suas frequências para as populações de casos e controles, análises de associação (OR) entre haplótipos e o desenvolvimento do câncer de mama, valores de p e intervalo de confiança (CI).....	94
Tabela 12 - Combinações haplotípicas inferidas para 3'UTR do <i>HLA-G</i> , suas frequências para as populações de casos e controles, análises de	

associação (OR) entre as combinações haplotípicas e o desenvolvimento do câncer de mama, valores de intervalo de confiança (CI) e *p*..... 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alelo adenina
APC	Células apresentadoras de antígenos, do inglês <i>antigen-presenting cells</i>
<i>BRCA1</i>	Câncer de mama 1 início precoce, do inglês <i>Breast cancer 1, early onset</i>
<i>BRCA2</i>	Câncer de mama 2 início precoce, do inglês <i>Breast cancer 2, early onset</i>
C	Alelo citosina
CDH1	do inglês <i>cadherin 1, type 1</i>
CEPSH-UFSC	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina
CI	Intervalo de confiança
<i>Del</i>	Alelo deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFG	Fator de Crescimento Epidermal, do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
et al.	“e outros”, do latim <i>et alii</i>
EWH	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
G	Alelo guanina
g	Gramas
HCL	Ácido clorídrico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HU-UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILT	Receptor de leucócito semelhante à imunoglobulina
IMC	Índice de massa corpórea
IMGT	<i>ImMunoGeneTics project</i>
<i>In</i>	Alelo inserção
<i>In/Del</i>	Inserção e deleção
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KIR	Receptor semelhante à imunoglobulina das células <i>natural killer</i> , do inglês <i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>

LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
<i>LMP2</i>	<i>Large multifunctional proteasome 2</i>
<i>LTβ</i>	Linfotoxina beta, do inglês <i>lymphotoxin β</i>
M	Molar
mA	miliamperagem
MgCl ²	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I chain-related gene</i>
miRNA	micro RNA
mL	militros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanogramas
NK	Células <i>Natural Killer</i>
n	Número amostral
OR	Razão de Chances, do inglês <i>Odds Ratio</i>
p	Braço curto, do francês <i>petit</i>
<i>p</i>	Probabilidade
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol
RCF	Força Centrífuga Relativa, do inglês <i>Relative Centrifugal Force</i>
RPM	Rotações por minuto
sHLA-G	HLA-G solúvel
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, inglês <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
<i>T</i>	Alelo timina
<i>TAP1</i>	<i>Transporter associated with antigen processing 1</i>
<i>TAP2</i>	<i>Transporter associated with antigen processing 2</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>TNFα</i>	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNM	Sistema de classificação (T: tumor primário; N: número de linfonodos; M: metástase)
TRH	Terapia de reposição hormonal
<i>TP53</i>	do inglês <i>tumor protein p53</i>

<i>U</i>	Unidade
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>untranslated region</i>
V	Voltagem
W	Unidade de potência (<i>Watt</i>)
β 2m	β 2-microglobulina
μ L	Microlitro
$^{\circ}$ C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 CÂNCER DE MAMA	22
1.1.1 Fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama	24
1.1.2 Genética e resposta imune do câncer de mama	25
1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	27
1.2.1 HLA-G: histórico e estrutura gênica	29
1.2.2 HLA-G: gene e molécula.....	33
1.2.3 Polimorfismos da 3'UTR do <i>HLA-G</i>	35
1.2.4 HLA-G e câncer.....	36
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	43
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	43
4.4 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO <i>14 PB IN/DEL</i> DA 3'UTR	45
4.4.1 Reação em cadeia da polimerase.....	45
4.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	46
4.4.3 Coloração com nitrato de prata	46
4.4.4 Leitura do gel.....	47
4.5 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA 3'UTR	49
4.5.1 Purificação das Amostras	49
4.5.2 PCR para a reação de sequenciamento	49
4.5.3 Precipitação das amostras	50
4.5.4 Sequenciamento das amostras.....	50
4.5.5 Análise das sequências	51
4.6 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4.6.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	52
4.6.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genótípicas	52
4.6.3 Diferenciação genética das populações.....	53
4.6.4 Análises de Associação	53
4.6.5 Desequilíbrio de Ligação.....	55
4.6.6 Inferência de Haplótipos.....	55
5 RESULTADOS	57
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	57

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e frequências alélicas e genotípicas	58
5.2.2 Diferenciação genética das populações.....	65
5.5.3 Análises de Associação.....	65
5.5.4 Desequilíbrio de Ligação	91
5.5.5 Inferência de haplótipos	93
6 DISCUSSÃO.....	99
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	99
6.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO	99
6.3 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS DE <i>HLA-G</i> E CÂNCER DE MAMA.....	106
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
REFERÊNCIAS.....	111
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) INDIVÍDUOS-CONTROLES	129
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE MAMA	131
ANEXO C – QUESTIONÁRIO INDIVÍDUOS-CONTROLES	133
ANEXO D – QUESTIONÁRIO DE INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE MAMA.....	137

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células e a capacidade de invadir tecidos adjacentes. Uma vez que estes tumores crescem, algumas células cancerosas podem desprender-se e deslocarem-se no corpo através do sangue ou sistema linfático e formar novos tumores longe do tumor primário, o que caracteriza o processo de metástase (NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI, 2016).

O câncer é considerado uma doença de etiologia complexa por apresentar causa multifatorial, ou seja, pode ser atribuído a uma série de fatores externos (exposição à radiação, aos agentes químicos e aos organismos infecciosos) e fatores internos (mutações e polimorfismos genéticos herdados, níveis hormonais e a condição imunológica do indivíduo) (AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS, 2016).

As estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer e da Organização Mundial da Saúde, apontaram a ocorrência de 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo no ano de 2012 (TORRE et al., 2015).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 (válidas também para 2017) preveem 596.000 novos casos de câncer. Entre os homens são esperados 295.200 casos, e entre as mulheres 300.800 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes para as mulheres devem ser os cânceres de pele não melanoma, mama, cólon e reto e colo do útero. As estimativas para cânceres em mulheres podem ser observadas na Figura 1 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2015).

Figura 1 - Estimativas dos números de novos casos de cânceres em mulheres, no Brasil, para o ano de 2016, discriminados conforme sua localização primária.

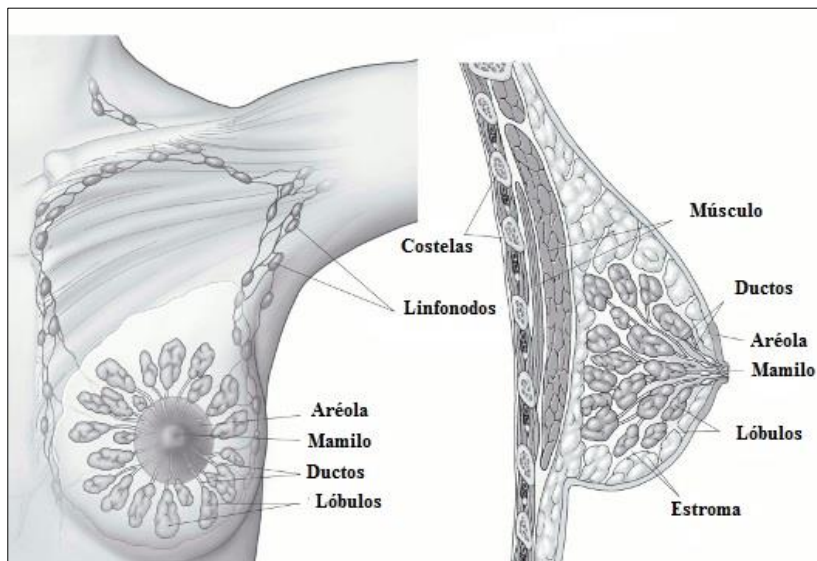
Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	205.960	
Todas as Neoplasias	300.870	

Fonte: INCA, 2015.

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama desenvolve-se no tecido mamário que é composto principalmente de lóbulos (glândulas produtoras de leite), ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo) e estroma (tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolve os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e linfáticos). A Figura 2 é uma representação esquemática de uma mama normal (ACS, 2016; INCA, 2015).

Figura 2 - Representação esquemática da composição de uma mama normal com vista frontal e lateral.



Fonte: ACS, 2016.

A maioria dos cânceres de mama começa nas células que revestem os ductos (carcinoma ductal). Alguns começam nas células que revestem os lóbulos (carcinoma lobular), enquanto um pequeno número se inicia em outros tecidos (ACS, 2016; BREASTCANCER.ORG, 2015).

O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama, totalizando, aproximadamente, 80 % dos casos. Ao longo do tempo, o carcinoma ductal invasivo pode se espalhar para os linfonodos e, possivelmente, para outras áreas do corpo. O carcinoma lobular invasivo é o segundo tipo mais comum, cerca de 10 % dos cânceres de mama. Há ainda, outros tipos de câncer de mama menos comuns como carcinoma tubular de mama, carcinoma medular de mama, carcinoma papilar de mama, câncer de mama inflamatório e Doença de Paget, que somam juntos aproximadamente 10 % dos casos (BREASTCANCER.ORG, 2015).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais frequente entre as mulheres. Nos Estados Unidos da América estimou-se, para o ano de 2015, 124 novos casos de câncer de

mama a cada 100 mil mulheres e 21 mortes a cada 100 mil mulheres (BREASTCANCER.ORG, 2015; NCI, 2016).

No Brasil as estimativas para o ano de 2016 apontam para ocorrência de 57.960 casos novos de câncer de mama. Para a região sul do Brasil são esperados 10.970 novos casos (INCA, 2015).

Para o Estado de Santa Catarina, para o ano de 2015, eram esperados cerca de 60 casos a cada 100 mil mulheres e para Florianópolis aproximadamente 80 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

1.1.1 Fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama

O câncer de mama, como descrito anteriormente para os cânceres, é considerado uma doença multifatorial que resulta de interações entre fatores genéticos, imunológicos, ambientais, comportamentais, hormonais e reprodutivos (INCA, 2014).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como: envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, história familiar de câncer de mama, consumo de álcool, excesso de peso, tabagismo, sedentarismo e exposição à radiação ionizante (ACS, 2016; DOSSUS et al., 2014; FERRARI et al., 2014; LOKATE et al., 2013; QUANTE et al., 2012; RITTE et al., 2013).

Os principais fatores de risco são ser mulher e possuir idade avançada. O risco aumenta se há histórico pessoal ou familiar da doença, especialmente com parentes de primeiro grau afetados, e quanto maior for o número de parentes afetados (INCA, 2014). Os dados mostram que aproximadamente 75 % das mulheres que desenvolvem o câncer de mama têm histórico familiar. As mulheres com um parente de primeiro grau que teve câncer de mama, possuem risco duas vezes maior de desenvolver esta doença. No caso de dois parentes de primeiro grau diagnosticados com câncer de mama, este risco aumenta em até cinco vezes (ACS, 2016). Há também um risco de cerca de 50 % para o desenvolvimento de câncer de mama quando há histórico pessoal (GARCIA et al., 2014).

Outro fator de risco importante, relacionado ao câncer de mama, é a exposição prolongada a elevados níveis dos hormônios estrogênio e progesterona. O principal efeito desses hormônios é estimular a proliferação celular, principalmente em órgãos femininos como o útero e a mama (órgãos responsivos a hormônios). Consequentemente, células com mutações de potencial cancerígeno, podem se multiplicar

(MITRUNEN e HIRVONEM, 2003). Uma maior exposição a esses hormônios acontece em mulheres com: menarca precoce (menor que 12 anos); menopausa tardia (após os 50 anos de idade); primeira gestação após os 30 anos de idade; nuliparidade; uso prolongado de anticoncepcionais e uso de terapia de reposição hormonal (ACS, 2015). Considerando isso, o número de ciclos ovarianos está diretamente relacionado ao risco de desenvolver o câncer da mama, esse risco é reduzido em cerca de 15 % a cada ano de retardo do início da menarca, e é aumentado aproximadamente 3 % a cada ano de retardo da menopausa (ACS, 2016; INCA, 2014).

A relação da exposição ao tabaco e o desenvolvimento do câncer de mama é controversa. Entretanto, tem sido demonstrado que mulheres regularmente expostas ao cigarro, incluindo fumantes passivas, apresentaram um aumento no risco de desenvolver câncer de mama, em oposição àquelas que nunca se expuseram ao tabaco (CONNOR et al., 2015; JOHNSON, 2005).

O sobrepeso e a obesidade são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama e estão associados a um pior prognóstico da doença (DIRAT et al., 2010). A obesidade e o sobrepeso são definidos como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que pode prejudicar a saúde do indivíduo, e que resulta da interação entre estilo de vida e fatores genéticos. O índice de massa corpórea (IMC) é a medida comumente usada para classificar o sobrepeso ($IMC \geq 25$) e a obesidade ($IMC \geq 30$) em adultos (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2016).

1.1.2 Genética e resposta imune do câncer de mama

Cada câncer, incluindo o câncer de mama, tem seu próprio arranjo de lesões genéticas. Indivíduos com câncer de mama com a mesma classificação histológica, possuem diferentes combinações de polimorfismos, corroborando a ideia de uma doença heterogênea. O desenvolvimento do câncer requer um acúmulo gradual de mutações em um número de genes diferentes, porém, algumas mutações são mais determinantes que outras (ALBERTS et al., 2010).

O câncer de mama pode ser classificado como hereditário quando há um maior envolvimento do componente genético, como no caso de herança de genes de alta penetrância, cujos produtos participam no reparo, na replicação e na transcrição do DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês *desoxyribonucleic acid*). Os mais conhecidos são os genes *BRCA1* e *BRCA2*, que, se mutados, aumentam para 85 % as chances de desenvolver câncer de mama. Porém, essas

mutações são raras na população em geral, sendo responsáveis por cerca de 5 a 10 % da incidência de câncer de mama (ACS, 2016; DUFLOTH et al., 2005).

Além dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, outros genes de alta penetrância foram identificados como associados à susceptibilidade ao câncer de mama familiar, tais como, TP53 (*tumor protein p53*), CDH1 (*cadherin 1, type 1*) e PTEN (*phosphatase and tensin homolog*). Assim, os casos de câncer de mama hereditários revelam um padrão de herança aparentemente dominante e são frequentemente caracterizados por uma idade de início precoce, desenvolvimento de câncer de ovário e câncer de mama bilateral (LARSEN et al., 2014).

É importante ressaltar que a maioria dos cânceres de mama é do tipo denominado esporádico, nos quais diversos fatores atuam em conjunto com vários genes de baixa penetrância. Esses genes possuem papel importante para a compreensão da etiologia multifatorial do câncer de mama (ACS, 2016; DUFLOTH et al., 2005; LARSEN et al., 2014).

O sistema imune desempenha um papel fundamental e complexo na biologia do câncer de mama (CIMINO-MATHEWS et al., 2015). O crescimento de células malignas é determinado, em grande parte, por sua capacidade de proliferar e invadir tecidos do hospedeiro (ABBAS et al., 2015). Assim, mecanismos que inibem a resposta imune e induzem tolerância são fundamentais para a sobrevivência dos tumores (ROBINSON et al., 2001).

Os genes cujos produtos exercem função crítica na regulação da resposta imune, como genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) têm um papel essencial nos mecanismos de defesa contra a carcinogênese. Os polimorfismos dos genes MHC que resultem em diferenças funcionais das moléculas expressas podem, por exemplo, interferir na apresentação de antígenos às células T (ABBAS et al., 2015).

As células cancerosas podem, eventualmente, perder a expressão de alguns tipos de moléculas MHC de classe I, devido a uma mutação no gene que codifica parte de sua cadeia. As células T CD8+ conseguem eliminar as células tumorais que expressem as moléculas MHC em sua superfície, mas não as que não expressem e, conseqüentemente, as células sem expressão sobrevivem e se proliferam (DONADI et al., 2011).

1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

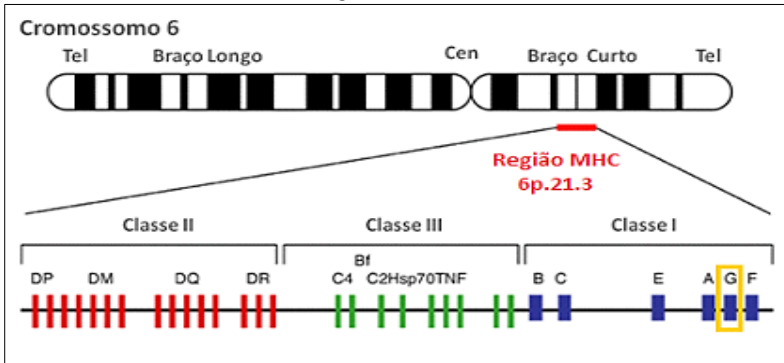
O sistema gênico caracterizado como MHC foi descrito por George Snell e colaboradores em 1936, a partir de estudos em camundongos durante transplantes. Posteriormente, complexos gênicos homólogos foram descritos em outras espécies de mamíferos, atuando de forma similar e codificando produtos moleculares envolvidos na resposta imune (ABBAS et al., 2015; CROUAEU-ROY et al., 1994).

Nos humanos, a descoberta do MHC ocorreu na década de 1950, por três pesquisadores, Jean Dausset, Jon van Rood e Rose Payne. Eles trabalhavam na identificação de anticorpos no soro de indivíduos que recebiam múltiplas transfusões sanguíneas (THORSBY, 2009). Em 1975, Doherty e Zinkernagel vincularam as moléculas MHC com a apresentação de antígenos (DOHERTY; ZINKERNAGEL, 1975).

Em 1999 um consórcio publicou a primeira sequência completa do MHC em humanos. Essa região é conhecida como a mais variável do genoma e apresenta um grande número de genes. Alguns desses genes também exibem muitas variantes (alelos), caracterizando uma região muito polimórfica (APPS et al., 2008; THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999).

O MHC humano é o conjunto gênico mapeado no cromossomo 6 (6p21.3), uma região de aproximadamente 3,6 megabases de DNA onde estão localizados mais de 200 genes (Figura 3) (CASTELLI et al., 2011; GARCÍA-OBREGÓN et al., 2011). Essa porção do genoma foi subdividida em regiões I, II e III, levando-se em consideração a estrutura e função dos produtos moleculares (HORTON et al., 2004). O Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) faz parte do MHC humano e produz moléculas que são expressas pelos leucócitos. As moléculas de classe I e II são conhecidas como responsáveis pela apresentação de antígenos às células T do sistema imune, além de outras funções (HVIID, 2006).

Figura 3 - Representação esquemática do MHC Humano. A localização da região do MHC humano no cromossomo 6 (6p21.3), a disposição de alguns genes dentro das classes II, III e I e em amarelo, destaque para a região estudada nesse trabalho, onde localiza-se o gene *HLA-G*.



Fonte: Adaptado de Mehra e Kaur, 2003.

Os genes mais conhecidos na região de classe I do MHC são *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (clássicos ou de classe Ia), altamente polimórficos e com expressão constitutiva na membrana celular de quase todas as células nucleadas. As moléculas produzidas por esses genes estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T (KLEIN e SATO, 2000). Os genes *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (não clássicos ou de classe Ib) são menos polimórficos que os de classe Ia. Alguns genes Ib possuem expressão tecidual restrita, como o caso do gene objeto do presente estudo, o *HLA-G*. As moléculas HLA de classe Ia e Ib são associadas a uma cadeia leve β 2-microglobulina (β 2m), codificada por um gene localizado no cromossomo 15. Além desses, os loci *HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*, *HLA-P*, *HLA-T*, *HLA-U*, *HLA-V*, *HLA-W*, *HLA-X* e *HLA-Y* são caracterizados como pseudogenes, ou seja, sem produto proteico associado (CASTELLI et al., 2009; FAINARDI et al., 2003; FISCHER e MAYR 2001; IMGT, 2016; RIZZO et al., 2012).

A região I do MHC apresenta ainda outros genes, como os do grupo MIC (*MHC class I chain-related gene*), relacionados com a ativação do receptor NKG2D de células *natural killer* (NK). As moléculas MIC, diferentemente das outras moléculas de classe I, não se associam a β 2m (COLLINS, 2004; GOLDBERG e RIZZO, 2015).

A região MHC de classe II possui genes que codificam moléculas expressas somente na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen-presenting cells*), como macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans e de Kupffer e linfócitos B. Algumas

moléculas de classe II estão contidas na região HLA-D, que foi subdividida nas sub-regiões DP, DM, DQ e DR. Outros genes são encontrados nessa região, como *TAP1* (*Transporter associated with antigen processing 1*) e *TAP2* (*Transporter associated with antigen processing 1*), *LMP2* (*Large multifunctional proteasome 2*), entre outros (LEWIN, 2009; PARHAM et al., 2012).

A região MHC de classe III possui genes que codificam moléculas importantes para a imunidade inata, como os que atuam na ativação do sistema complemento, como Bf, C2, C4A, C4B, genes que codificam citocinas, como *TNF α* (Factor de Necrose Tumoral, do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*) e *LT β* (Linfotoxina beta, do inglês *Lymphotoxin β*), entre outros (LEWIN, 2009).

1.2.1 HLA-G: histórico e estrutura gênica

Em 1987 o *HLA-G* foi o primeiro gene MHC de classe Ib a ser descrito. Esse gene foi primeiramente identificado em células de trofoblasto e coriocarcinoma. Na época de sua descrição a diferença estrutural observada na molécula de *HLA-G*, foi sua cauda citoplasmática reduzida, quando comparada às moléculas clássicas (GERAGHTY et al., 1987).

A primeira função associada à molécula foi que esta funciona como ligante para receptor inibitório de células NK em células uterinas, contribuindo para tolerância materno-fetal (ROUAS-FREISS et al., 1997).

O gene *HLA-G* apresenta uma estrutura genética semelhante a outros genes de classe I, como *HLA-A*, *HLA-B*, e *HLA-C*. Codifica uma molécula ligada à membrana com os mesmos domínios extracelulares apresentados por outras moléculas de classe Ia, incluindo a associação com a β 2m. No entanto, a sua principal função não é a apresentação de antígeno. Outra característica que o difere dos genes de classe Ia é que o gene *HLA-G* é bastante conservado entre as diferentes populações e dentro da mesma população (CASTELLI et al., 2014a; DONADI et al., 2011).

Não há consenso quanto ao local exato onde a transcrição do *HLA-G* começa. Acredita-se que é possível que o gene *HLA-G* apresente mais de um ponto de início da transcrição, dependendo da presença de fatores de transcrição específicos ou outros mecanismos que induzem a expressão (CASTELLI et al., 2014a).

Com relação a tradução, os dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) sugerem que o gene *HLA-G* possui três possíveis pontos de início de tradução, dois na região anotada como 5'

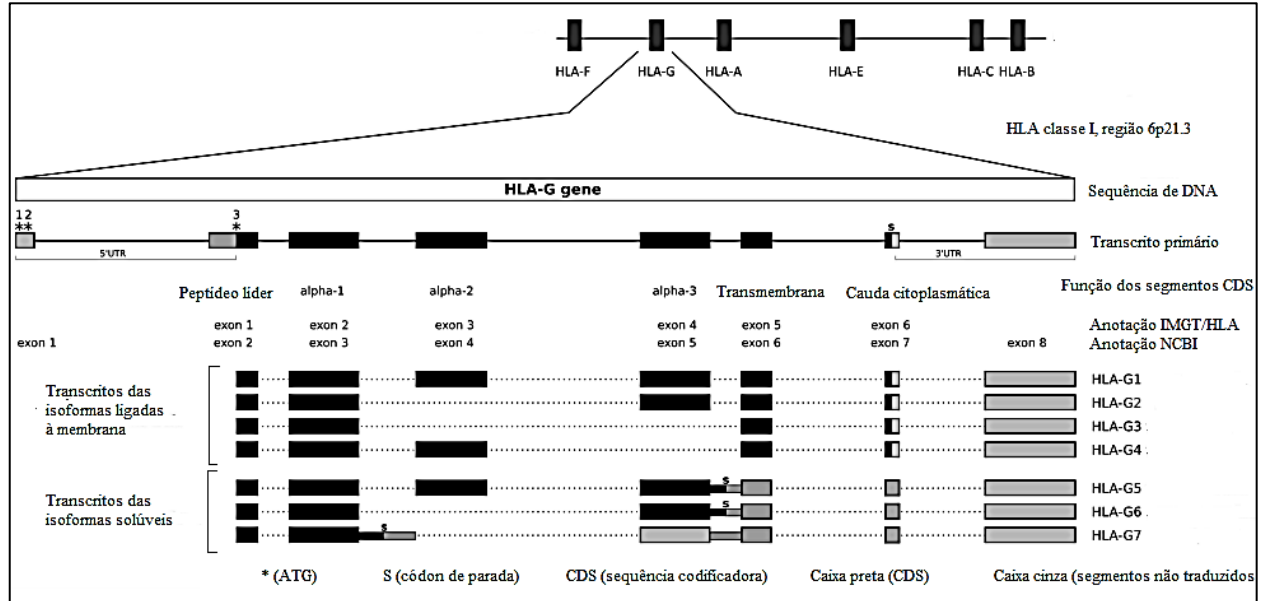
não traduzida (5'UTR, do inglês *5' untranslated region*) e um terceiro no início da sequência descrita como codificadora. Essa anotação considera a primeira base do fragmento traduzido como a primeira base para fins de nomenclatura. Todos os nucleotídeos antes dessa primeira base são anotados com números negativos e todos os nucleotídeos depois com números positivos (CASTELLI et al., 2014a).

Com relação a estrutura do gene, alguns estudos afirmam que o *HLA-G* é composto por oito éxons e sete íntrons. Porém o éxon 7 é sempre removido durante o processamento, estando ausente no RNA mensageiro (mRNA) maduro e, portanto, com comportamento semelhante a um íntron e o éxon 8 não é traduzido, portanto, esse segmento gênico tem sido considerado a região 3' não traduzida (3'UTR, do inglês *3' untranslated region*) do mRNA maduro (DONADI et al., 2011; MOREAU et al., 2009). A denominação de oito éxons foi mantida para o *HLA-G* seguindo a utilizada para os genes HLA de classe Ia.

Mais recentemente, Castelli e colaboradores (2014a) discutem que não há consenso em relação a nomenclatura dos éxons e íntrons entre os bancos de dados (IMGT e NCBI/Ensembl), e assume como mais completa a nomenclatura definida pelo NCBI/Ensembl.

O IMGT, que segue o padrão de nomenclatura HLA de classe Ia para todos os genes HLA, considera como o éxon 1, o primeiro segmento de mRNA que é traduzido, ou seja, o éxon 2 de NCBI/Ensembl (Figura 4). O éxon 1 do NCBI/Ensembl é parte inicial da 5'UTR, que se mantém no mRNA maduro. O éxon 2 do NCBI/Ensembl, codifica a porção final da 5'UTR e contém o principal ponto de iniciação da tradução. Os éxons 3, 4, e 5 codificam os domínios α -1, α -2 e α -3, respectivamente. O éxon 6 codifica o domínio transmembranar e o éxon 7 a cauda citoplasmática. Um códon de parada prematuro no éxon 7 leva a uma cauda citoplasmática curta quando comparada com outras moléculas de classe Ia. O segmento a jusante do códon de parada, que se estende do éxon 7 ao éxon 8 compõe a 3'UTR (CASTELLI et al., 2014a).

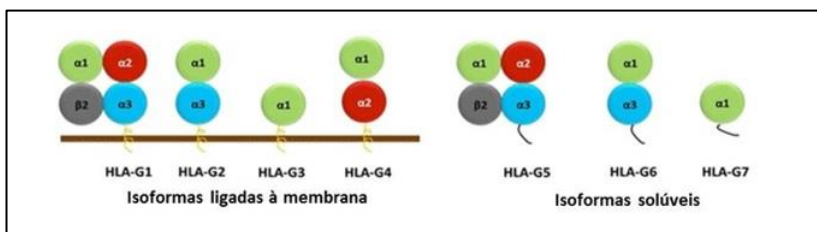
Figura 4 - Representação esquemática do gene *HLA-G* e seus transcritos.



Fonte: adaptado de Castelli et al., 2014a.

O *HLA-G* possui 4.396 pares de base (pb) e foram identificadas sete isoformas proteicas (Figura 5) geradas por processamento alternativo do transcrito primário (Figura 4). Quatro isoformas são ligadas à membrana e apresentam o domínio transmembranar e a cauda citoplasmática curta. Três isoformas são solúveis devido à falta do domínio transmembranar (DONADI et al., 2011).

Figura 5 - Representação esquemática das sete isoformas proteicas do *HLA-G* geradas por processamento alternativo, sendo quatro ligadas à membrana plasmática e três solúveis.



Fonte: adaptado de Donadi et al., 2011.

A molécula HLA-G1 é a isoforma completa da proteína. Essa isoforma, ligada à membrana, apresenta uma estrutura extracelular semelhante às moléculas HLA de Classe Ia: uma cadeia pesada formada pelos três domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) associados, de maneira não covalente, à $\beta 2m$. A isoforma HLA-G2, por outro lado, não possui o domínio $\alpha 2$. O HLA-G3 não apresenta os domínios $\alpha 2$ e $\alpha 3$ e a molécula HLA-G4 não possui o domínio $\alpha 3$. As isoformas solúveis HLA-G5 e HLA-G6 apresentam os mesmos domínios globulares de HLA-G1 e HLA-G2, respectivamente, e são produzidas sem o domínio transmembranar e com uma cauda de 21 aminoácidos que implica na solubilidade dessas moléculas. A isoforma HLA-G7 tem somente o domínio $\alpha 1$ e a cauda citoplasmática (DONADI et al., 2011; MOREAU et al., 2009).

Apesar das funções das isoformas ainda serem pouco compreendidas, foi proposto que elas podem estar envolvidas na modulação da resposta imune em diversas situações fisiológicas. A produção das diferentes isoformas de HLA-G é direcionada por mecanismos de regulação e, dependendo da situação fisiológica e do tipo celular envolvido, algumas isoformas são expressas e outras não (CAMPBELL et al., 2012). A expressão dessas isoformas pode estar relacionada à capacidade de diferentes tipos celulares responderem a fatores ambientais. Esses fatores podem ser endógenos, como, estresse,

privação de nutrientes, hormônios e citocinas (por exemplo, o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF), IFNs (Interferons), IL-10 (Interleucina 10), TNF α , TGF β e o Fator de Crescimento Epidermal (EGF)) e fatores exógenos como, por exemplo, fármacos. Esses fatores, aliados aos polimorfismos do *HLA-G*, podem regular a expressão desse gene tanto no nível transcricional, quanto no nível pós-transcricional (CAROSELLA et al., 2011).

1.2.2 HLA-G: gene e molécula

O *HLA-G* se diferencia dos genes de classe Ia pelo processamento alternativo e pela cauda citoplasmática curta, que foram anteriormente discutidos, mas, também, pela modulação da resposta imune (imunotolerância), pela expressão restrita a certos tecidos e pela limitada variabilidade proteica (CAROSELLA et al., 2008; DONADI, 2011).

A molécula de HLA-G atua na modulação da resposta imune, interagindo com determinados receptores de membrana, presentes em diversos tipos celulares, inibindo as respostas do sistema imune. Exerce funções inibidoras contra células NK, linfócitos T e APCs através da interação direta com três tipos receptores inibidores. O receptor de leucócito semelhante à imunoglobulina ILT2 (ILT2/CD85j/LILRB1) é expresso por monócitos, células B, algumas linhagens de células T e células NK. O receptor de leucócito semelhante à imunoglobulina ILT4 (ILT4/CD85d/LILRB2) é expresso apenas por monócitos e células dendríticas. O receptor de célula NK semelhante à imunoglobulina KIR2DL4 (KIR2DL4/CD158d) que tem uma expressão restrita a células NK CD56 (KAMISHIKIRYO e MAENAKA, 2009; MENIER et al., 2002; RAJAGOPALAN e LONG, 1999; ROUAS-FREISS et al., 1997; SHIROISHI et al., 2006). Para o receptor KIR2DL4 há dados controversos na literatura que indicam que este pode não ser ligante de HLA-G (LE PAGE et al., 2014).

Esses três receptores são expressos de maneira diferenciada por cada um dos tipos celulares descritos, e os efeitos das suas interações com HLA-G têm sido demonstrados. A molécula HLA-G pode inibir, por exemplo, as funções citolíticas das células NK; a maturação de células dendríticas; as funções citolíticas antígenos-específicas das células T CD8+, as respostas aloproliferativas das células T CD4+; a produção de citocinas por células T, além de induzir a apoptose celular (DONADI et al., 2011). Essas características têm feito dessa molécula um alvo de estudos para a compreensão dos mecanismos de diversas situações clínicas como, por exemplo: cânceres, mas também infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes, assim como no contexto de

gravidez e transplantes e suas complicações (CAROSELLA et al., 2008; CAROSELLA et al., 2011; CAROSELLA et al., 2015; DONADI et al., 2011).

Em condições fisiológicas, a presença do mRNA do *HLA-G* é encontrada em baixos níveis na maioria das células e tecidos. No entanto, a tradução em proteínas tem localização tecidual restrita. A molécula é expressa na interface materno-fetal, superfície de células do trofoblasto, células fetais endoteliais e fluido amniótico, conferindo imunotolerância (BLASCHITZ et al., 2011; CAROSELLA e HORUZSKO, 2007; HAMMER et al., 1997). A molécula *HLA-G* foi observada também na córnea, timo, pâncreas, precursores endoteliais e eritroides e matriz da unha (CAROSELLA et al., 2008). Dependendo da situação clínica, a expressão de *HLA-G* pode ser benéfica ou prejudicial ao organismo. Em condições patológicas, nas quais uma resposta imune vigorosa e prolongada é necessária, a expressão de *HLA-G* é prejudicial, como nos casos de câncer e doenças virais. Opostamente a isso, nos casos em que uma resposta imune vigorosa é indesejável, a presença de *HLA-G* é vantajosa, como nos casos de transplantes e de doenças autoimunes (DONADI et al., 2011).

O *HLA-G* possui 51 alelos descritos, que codificam 17 proteínas distintas (IMGT, 2016) e, por isso, é considerado pouco polimórfico quando comparado com os genes *HLA* de classe Ia. Os polimorfismos da região codificadora são distribuídos entre os domínios α -1, α -2 e α -3, enquanto que nos genes da classe Ia, os polimorfismos são encontrados principalmente na região que codifica a parte de ligação dos peptídeos, os domínios α -1 e α -2 (CASTELLI et al., 2014a).

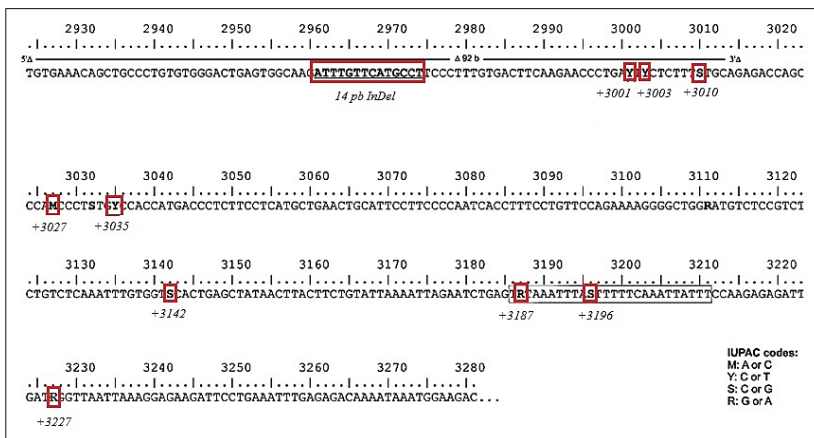
As regiões reguladoras, promotora e 3'UTR, apresentam um grau de variações nucleotídicas mais alto quando comparado com a região codificadora (DONADI et al., 2011).

De acordo com Castelli e colaboradores (2014a) a região promotora do *HLA-G* possui 34 sítios polimórficos. Essas variações podem implicar, diretamente, na regulação da expressão desse gene, uma vez que, muitos desses polimorfismos estão dentro ou próximos de conhecidos ou supostos elementos reguladores da transcrição (CASTELLI et al., 2014b; MOREAU et al., 2009).

A 3'UTR do *HLA-G*, alvo de estudo do presente trabalho, possui 17 locais de variação descritos, mas nem todos são considerados polimorfismos. Dez sítios polimórficos descritos foram considerados neste trabalho: um polimorfismo de presença (inserção ou *In*) ou ausência (deleção ou *Del*) de um fragmento de 14 pb (14 pb *InDel*) e nove polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single-*

Nucleotide Polymorphisms) (+3001 T/C, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G, +3196 G/C e +3227 A/G) (Figura 6) (CASTELLI et al., 2014a; LARSEN e HVIID, 2009).

Figura 6 - Sequência de nucleotídeos da 3'UTR do gene *HLA-G*, onde estão identificados 10 sítios de variações polimórficas considerados no presente estudo (destacados com retângulo vermelho).



Fonte: adaptado de Donadi et al., 2011.

1.2.3 Polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G*

Os polimorfismos do gene *HLA-G* têm sido associados com várias doenças, entre elas tumores (CASTELLI et al., 2008). Dependendo dos polimorfismos encontrados no gene *HLA-G*, assim como a presença de fatores endógenos e microambientais, a expressão de *HLA-G* pode ser aumentada ou reduzida. A 3'UTR exibe variações de nucleotídeos que podem influenciar os níveis de expressão de *HLA-G* (DONADI et al., 2011).

A 3'UTR do *HLA-G* contém vários elementos regulatórios, incluindo sinais de poliadenilação (KUERSTEN e GOODWIN, 2003), regiões ricas de elementos AU (ALVAREZ et al., 2009) e sítios polimórficos que podem potencialmente influenciar a transcrição e a tradução, através de ligações com micro RNA (miRNA) (DONADI et al., 2011; KUERSTEN e GOODWIN, 2003). Os polimorfismos da 3'UTR podem alterar a estabilidade do mRNA, sua tradução, localização, degradação, bem como a expressão do *HLA-G* (DONADI et al., 2011; LARSEN e HVIID, 2009).

Um dos polimorfismos encontrados na 3'UTR é o *14 pb In/Del*. O alelo *In* foi associado, em amostras de trofoblasto, à menor produção de mRNA tanto para as isoformas ligadas à membrana quanto para as solúveis. Por outro lado, uma fração dos mRNA que apresentam a inserção de *14 pb* pode ser alternativamente processada, quando ocorre a remoção de 92 bases do mRNA maduro. Esse processo resulta em transcritos de HLA-G menores, os quais têm sido relatados como formas mais estáveis da molécula do que os mRNA completos (DONADI et al., 2011).

O SNP na posição +3142 foi descrito como um possível sítio de ligação para determinados miRNA, sendo que estes se ligam com maior afinidade ao alelo *G*. Essa estabilidade de ligação pode ter uma relação direta com o controle dos níveis de expressão da molécula (TAN et al., 2007). O SNP na posição +3187 foi relacionado com a estabilidade do mRNA e sua degradação. O alelo *G* foi relacionado a um aumento da produção de HLA-G. Os mecanismos que estão envolvidos nesses processos ainda não estão totalmente elucidados (DONADI et al., 2011).

1.2.4 HLA-G e câncer

Diversos estudos relatam associações entre o aumento da expressão de *HLA-G* em diferentes tipos de câncer: carcinoma hepatocelular (LIN et al., 2010; PARK et al., 2012); câncer colorretal (YE et al., 2007; ZEESTRATEN et al., 2014); melanoma (IBRAHIM et al., 2004; BEZUHLY et al., 2008; FANG et al., 2008); câncer de esôfago (CAO et al., 2011; HU et al., 2013; LIN et al., 2011; ZHENG et al., 2014); câncer de pulmão (CAO et al., 2011; YIE et al., 2007); glioblastoma (KREN et al., 2011), entre outros. Na maior parte dos estudos, o aumento da expressão de *HLA-G* é associado com estágios avançados da doença, maior tamanho do tumor e presença de metástase.

O aumento da expressão do *HLA-G* em câncer de mama foi observado em diversos estudos (CHEN et al., 2010; ELLIOTT et al., 2011; HE et al., 2010; KRUIJF et al., 2010; LEFEBVRE et al., 2002; RAMOS et al., 2014; SAYED et al., 2010; SILVA et al., 2013). Um desses estudos relatou o aumento dos níveis de HLA-G solúvel (sHLA-G) em amostras de câncer de mama e este foi associado com uma maior agressividade tumoral (CHEN et al., 2010). No estudo de Sayed e colaboradores (2010) os níveis de sHLA-G se apresentaram menores em indivíduos com câncer de mama após a cirurgia para a retirada do tumor.

Resultados como a expressão de *HLA-G* pelo tumor, o aumento dos níveis de sHLA-G e o aumento dos níveis de IL-10, uma citocina

que induz a expressão de HLA-G, estão relacionados com um pior prognóstico do câncer de mama e de diversos outros cânceres analisados (DIAS et al., 2015).

Vários segmentos isolados do gene *HLA-G* têm sido estudados em tumores, destacando a 3'UTR, e o polimorfismo *14 pb In/Del* é o mais estudado. Em mulheres com câncer de mama, o alelo *14bp Del* e o genótipo *14 pb Del/Del* foram associados com a susceptibilidade ao câncer de mama no Irã (ESKANDARI-NASAB et al., 2013) e mulheres da Coreia (JEONG et al., 2014). Para polimorfismos da região codificadora dois estudos com câncer de mama não encontraram associação em amostras coreanas e brasileiras (JEONG et al., 2014; ROLFSEN et al., 2014). Até a presente data não foram publicados estudos com os haplótipos existentes da 3'UTR do gene *HLA-G* e câncer de mama.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama, por ter uma alta incidência, é considerado um grande problema de saúde pública, pois gera prejuízos aos órgãos de saúde governamentais e principalmente às mulheres acometidas. Por se tratar de uma doença multifatorial faz-se necessário o estudo de sua etiologia, dos fatores genéticos associados e sua relação com os fatores ambientais.

Considerando que a expressão de *HLA-G* está relacionada ao escape da imunovigilância em diversos tumores e a expressão pode ser influenciada por polimorfismos, principalmente na 3'UTR, torna-se interessante avaliar se a variabilidade dessa região do gene pode estar relacionada ao desenvolvimento do câncer de mama na população brasileira.

Tendo como hipótese que pacientes e controles apresentem diferentes frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas da 3'UTR e, sabendo que essas diferenças podem gerar variados níveis de expressão da molécula HLA-G, pretende-se, nesse estudo, verificar as frequências nos dois grupos e averiguar se há associação com risco ou proteção ao câncer de mama e fatores de risco, assim como correlacioná-los com as possíveis variações de expressão. As associações entre o câncer de mama e determinados polimorfismos do gene *HLA-G* podem, no futuro, auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e no direcionamento de terapias para essa patologia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* em mulheres com câncer de mama e em mulheres sem evidência de câncer de mama, visando compreender a ação deste gene no desenvolvimento da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a variabilidade da 3'UTR do gene *HLA-G* em mulheres com câncer de mama e sem, pareadas por idade, no estado de Santa Catarina.
- Analisar as frequências alélicas, genótípicas, haplotípicas e das combinações de haplótipos encontradas na 3'UTR do gene *HLA-G* nos grupos casos e controles.
- Investigar possíveis associações entre os alelos, genótipos, haplótipos, combinações haplotípicas, dados epidemiológicos e clínicos com o câncer de mama.
- Relacionar os dados encontrados neste estudo com a patogênese do câncer de mama.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, coordenado pela Dra. Yara Costa Netto Muniz, intitulado “Câncer de Mama: busca de miRNA que controlam a expressão de HLA-G, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnósticos e opções terapêuticas”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), no parecer n° 922.167, de 07 de dezembro de 2014.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 193 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, que formaram o grupo casos, atendidas pelo Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) e de 193 mulheres sem diagnóstico para a patologia em estudo, que formaram o grupo controles. As mulheres do grupo controles são participantes de projetos realizados paralelamente pela equipe do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexos A e B) pelos grupos controles e casos, os dados familiares e epidemiológicos das mulheres foram obtidos por entrevistas realizadas com questionários estruturados (anexos C e D). Após as entrevistas, amostras de sangue periférico (cerca de 8 mL) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico e obtenção dos dados genéticos, e armazenadas e transportadas a 4 °C para o posterior processamento no LAPOGE.

As amostras biológicas e os questionários obtidos foram catalogados e fazem parte de um banco de dados e amostras, de indivíduos com câncer de mama e de indivíduos-controles, armazenados no LAPOGE. Os dados clínicos das mulheres com câncer foram obtidos nos prontuários médicos. Alguns desses dados foram utilizados para correlacionar com os dados genéticos obtidos nesse trabalho.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (*Centrifuge 206 BL Excelsa II*®) a 3000 RCF (1835 RPM) durante 20 minutos a temperatura ambiente, para a separação dos componentes

sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos, e feitas alíquotas, que foram identificadas e estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os leucócitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. O plasma e o concentrado de hemácias foram armazenados para futuras pesquisas.

Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01 M, Amresco®; Sacarose 0,32 M, Merck®; MgCl₂ 0,0025 M; Triton X 100 – 1 %, Nuclear®);
- 2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01 M, Amresco®; KCl 0,05 M, Vetec®); MgCl₂ 0,0025 M, Nuclear®); Nonidet – 1 %, Amresco®; TWEEN 20 – 1 %, Amresco®);
- 3) SDS 10 % (Amresco®);
- 4) Solução de Perclorato de Sódio 5,0 M (Vetec®);
- 5) Solução Saturada de NaCl 6,0 M (Nuclear®);
- 6) TE (Tris-HCl 1 M, Amresco®; EDTA 0,5 M, Vetec®);
- 7) Álcool Isopropílico Absoluto (Merck®);
- 8) Etanol 70 % (Merck®).

Procedimento

A extração de DNA foi realizada através do método de *Salting Out* modificado, baseado em Miller e colaboradores (1988). Para cada amostra, foram colocados 100 μL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5 mL (tipo *Eppendorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, adicionou-se 1 mL de Solução de Lise I em cada um dos microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D*, *Eppendorf*®) a 13400 RCF (12000 RPM) durante 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando a presença dos glóbulos brancos. Posteriormente, foram acrescentados ao precipitado de leucócitos 300 μL de Solução de Lise II, 10 μL de SDS 10 % e 75 μL de Perclorato de Sódio 5 M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos e a cada tubo foram acrescentados 130 μL de NaCl 6 M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400 RCF (12000 RPM) por 5 minutos a temperatura ambiente. Novos microtubos de 1,5 mL foram identificados e, para estes, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300 μL de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400 RCF (12000 RPM) por 15 minutos. O

sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 300 μL de Etanol 70 %. As amostras foram centrifugadas a 13400 RCF (12000 RPM) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, a temperatura ambiente, *overnight*. Após a secagem dos precipitados, foram adicionados a cada tubo 100 μL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56 °C, por 30 minutos e, posteriormente, armazenadas a -20 °C.

4.4 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO 14 PB IN/DEL DA 3'UTR

A genotipagem do polimorfismo 14 pb In/Del (rs1704) da 3'UTR do gene *HLA-G* (ID:3135), foi realizada pela amplificação da região flanqueadora de interesse pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para migração dos fragmentos de DNA amplificados, com a visualização dos mesmos no gel após coloração com Nitrato de Prata.

4.4.1 Reação em cadeia da polimerase

Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura;
- 2) dNTPs 0,2 mM de cada (100 mM, Invitrogen®);
- 3) MgCl_2 1,5 mM (50 mM, Invitrogen®);
- 4) Tampão de PCR 10X (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl; Invitrogen®);
- 5) Primer Reverse 10 pmol (HLAGR, 5'- TCT TCT GAT AAC ACA GGA ACT TC -3'; IDT®);
- 6) Primer Forward 10 pmol (HLAGF, 5'- TGT GAA ACA GCT GCC CTG T -3'; IDT®);
- 7) Taq DNA Polymerase Platinum (0,5 U/ μL ; Invitrogen®).

Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados, em tubos de 0,2 μL (tipo *Eppendorf*): 7,40 μL de água; 0,25 μL de dNTPs; 0,75 μL de MgCl_2 ; 3,5 μL de Tampão de PCR; 0,5 μL de *Primer R*; 0,5 μL de *Primer F*; 0,10 μL de *Taq Platinum*® e 2 μL de DNA (200 ng). Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos e, em seguida, a 30 ciclos de: 95 °C por 45 segundos, 56 °C por 45 segundos e 72 °C por 60 segundos; e um passo de extensão final a 72 °C por 7 minutos (CASTELLI et al., 2010).

4.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Reagentes e Soluções

- 1) *Água Ultrapura*;
- 2) *Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1 – 29 g de acrilamida, Bioamerica®, e 1g de bis-acrilamida, Amresco®, diluídas em 100 mL H₂O)*;
- 3) *Tampão TBE 10X (Tris base 0,89 M, Amresco®; Ácido Bórico 0,89 M, Vetec®; EDTA 0,2 M, Vetec®)*;
- 4) *Tampão TBE 1X (100 mL do Tampão TBE 10X; 900 mL H₂O)*;
- 5) *TEMED: tetrametiletilenodiamina (Amresco®)*;
- 6) *Persulfato de Amônio 10 % (Hexapur®)*;
- 7) *Tampão de Aplicação de Amostras (900 µL de Bromofenol, Merck®; 900 µL Xilenocianol, Sigma-Aldrich®; 900 µL TBE; 4,5 mL Ficoll 30 % diluído em H₂O, Sigma-Aldrich®; 1,8 mL EDTA 0,5 M pH 8,0, Vetec®; 3,6g Sacarose, Merck®)*;
- 8) *Formaldeído (Amresco®)*;
- 9) *Peso Molecular de 100 pb (BioLabs®)*.

Procedimento

Os produtos amplificados (nos tamanhos de 597 pb para as deleções e de 611 pb para as inserções) foram visualizados por PAGE 7 %. Esses géis foram preparados utilizando: 21 mL de Água Ultrapura; 6 mL de Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida; 3 mL de TBE 10 %; 35µL de TEMED e 350 µL de Persulfato de Amônio 10 %. Essa solução foi colocada entre as placas de vidro e, após a polimerização do gel, as placas foram encaixadas na cuba de eletroforese. As amostras foram preparadas da seguinte forma: 5 µL de produto de PCR; 2 µL de Tampão de Aplicação de Amostras e 3 µL de água; e, posteriormente, aplicadas no gel. No primeiro poço foi colocado o padrão de peso molecular de 100 pb para, posteriormente, ser comparado com as bandas amplificadas. A corrida foi realizada, durante 3 horas, e a fonte de eletroforese (CBS, Scientific Company, Modelo EPS 4000) foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 160 e, a Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.

4.4.3 Coloração com nitrato de prata

Os géis foram retirados das cubas e corados com nitrato de prata para a visualização dos fragmentos de DNA.

Reagentes e Soluções

1) *Solução de Nitrato de Prata* (10 g de Nitrato de Prata, Vetec®; 100 mL de H₂O. Dissolver o nitrato de prata em uma parte da água e depois completar com o restante, manter a solução ao abrigo da luz - volume final 100 mL);

2) *Solução Fixadora* (160 mL de Etanol Absoluto, Merck®, 7 mL de Ácido Acético Glacial, Nuclear® e 833 mL de H₂O - volume final 1 L);

3) *Solução Reveladora* (22,5 g de NaOH, Merck®; 1L de H₂O. Dissolver em um agitador o Hidróxido de Sódio em uma parte da água e depois completar com o restante - volume final 1 L. Na hora da coloração adicionar 1 mL de Formaldeído para cada 100 mL da solução).

Procedimento

1) *Fixação*: após a retirada das placas de vidro o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 100 mL de solução fixadora por 10 minutos;

2) *Impregnação com nitrato de prata*: adicionou-se 2 mL de solução de nitrato de prata, e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água aquecida a aproximadamente 50 °C por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água;

3) *Revelação*: a solução reveladora foi adicionada no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns aproximadamente 2 minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução foi pré-aquecida em estufa a 65 °C, para facilitar a reação;

4) *Bloqueio da reação*: após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 100 mL de solução fixadora;

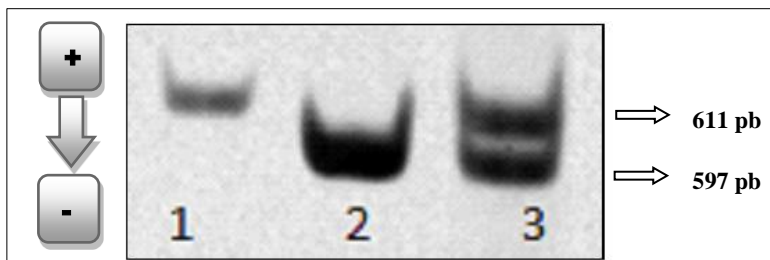
5) *Secagem do gel*: após a leitura, todos os géis passaram por um processo de secagem simples para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram molhadas e uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas. O gel foi colocado sobre a placa com o celofane e coberto com a outra folha de celofane com cuidado de não deixar bolhas. O gel foi deixado a temperatura ambiente até a secagem completa, sendo então destacado, identificado e arquivado.

4.4.4 Leitura do gel

O modo de visualização dos fragmentos de DNA, para a detecção e anotação do polimorfismo de 14 pb In/Del do gene *HLA-G*, está

representado na Figura 7. Na figura, é possível observar a presença de uma inserção (1), uma deleção (2) e uma inserção/deleção (3).

Figura 7 - Fotografia de gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. O gel ilustra bandas relativas à amplificação de um fragmento da 3'UTR do *HLA-G* que apresentam diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA devido ao polimorfismo *14 pb In/Del*. A coluna 1 representa um indivíduo com genótipo *InIn*; a 2 um indivíduo com genótipo *DelDel*; e a coluna 3 representa um indivíduo heterozigoto *InDel*.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

4.5 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA 3'UTR

4.5.1 Purificação das Amostras

Reagentes e Soluções

- 1) *Exonuclease I (EXO, 10 U/μL, GE Healthcare®)*;
- 2) *Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP, do inglês Shrimp Alkaline Phosphatase, 1 U/μL, GE Healthcare®)*;

Procedimento

Os produtos de PCR foram purificados com o uso das enzimas EXO e SAP para a degradação do excesso de *primers* e para a desfosforilação dos dNTPs não incorporados. Para isso foram adicionados, em um tubo de 0,2 μL (tipo *Eppendorf*), 0,5 μL de EXO, 0,5 μL de SAP e 9 μL de produto de PCR. As amostras foram colocadas em um termociclador e submetidas a um ciclo de reação de 37 °C por 60 minutos e 75 °C por 15 minutos.

4.5.2 PCR para a reação de sequenciamento

A reação de PCR foi realizada utilizando o reagente *BigDye®* versão 3.1 e o *primer* reverso (HLA8R), anteriormente descrito. Este último foi utilizado, devido ao polimorfismo *In/Del*, com o intuito de evitar o desalinhamento das sequências em amostras heterozigotas para esse polimorfismo.

Reagentes e Soluções

- 1) *Água Ultrapura*;
- 2) *Primer Reverse diluído 5 pM (HLAGR,5'- TCT TCT GAT AAC ACA GGA ACT TC -3')*;
- 3) *Corante BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems®)*;
- 4) *Tampão BigDye® Terminator Sequencing Buffer 5X (Applied Biosystems®)*;

Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços: 1 µL de *Primer R*; 1 µL de fluoróforo BigDye®, 1,5 µL Tampão BigDye® e 6,5 µL de produto de PCR purificado. Essas amostras foram colocadas em um termociclador (Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 96 °C por 10 segundos e, a seguir, a 25 ciclos de: 96 °C por 10 segundos; 50 °C por 5 segundos e 6 0°C por 4 minutos.

4.5.3 Precipitação das amostras

Reagentes e Soluções

- 1) *Solução de Acetato de Sódio/EDTA, temperatura ambiente; (Acetato de Sódio 125 mM, Sigma-Aldrich®; pH 8,0)*;
- 2) *Etanol Absoluto, temperatura ambiente (Merck®)*;
- 3) *Etanol 70 %, temperatura ambiente (Merck®)*.

Procedimento

A precipitação dos produtos de PCR purificados foi feita da seguinte maneira: em cada poço (nos quais estavam os 9 µL da PCR de sequenciamento) foram adicionados 2,5 µL da Solução de Acetato de Sódio /EDTA, a placa foi agitada e, em seguida, foram adicionados 25 µL de Etanol Absoluto. Em seguida, a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5804R, Eppendorf®*) a 2880 RCF (4000 RPM) por 45 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido por inversão e, posteriormente, foram adicionados 150 µL de etanol 70 % em cada poço. A placa foi agitada e submetida a uma nova centrifugação a 2880 RCF (4000 RPM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa foi deixada sem exposição à luz, *overnight*, para que todo o etanol evaporasse.

4.5.4 Sequenciamento das amostras

Reagentes e Soluções

1) Formamida Hi-Di (Invitrogen®).

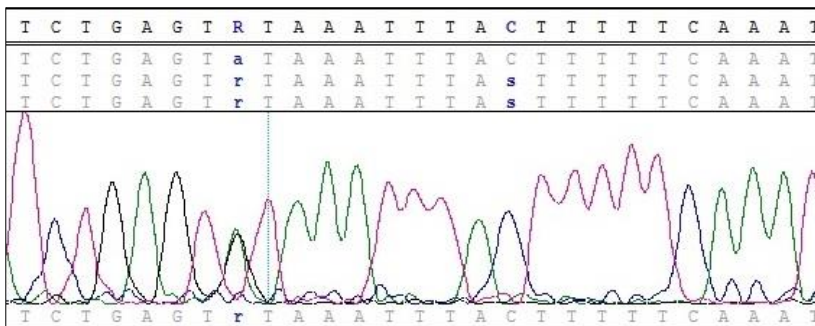
Procedimento

Em cada poço da placa, foram adicionados 10 µL de Formamida e a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5804R, Eppendorf®*) a 500 RCF (800 RPM) por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação, em termociclador (*Mastercycler, Eppendorf®*), a 95 °C durante 20 minutos. Após a desnaturação, a placa foi colocada no sequenciador para ser lida. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems®*).

4.5.5 Análise das sequências

A análise direta das sequências de DNA, da 3'UTR, foi realizada, através do *software Chromas Lite®*, para a investigação de todos os pontos de variação existentes na região. As variações para essa região são os polimorfismos SNP: +3001 T/C (rs567747016), +3003 T/C (rs1707), +3010 C/G (rs1710), +3027 A/C (rs17179101), +3035 C/T (rs17179108), +3142 G/C (rs1063320), +3187 A/G (rs9380142), +3196 G/C (rs1610696) e +3227 A/G (rs1233331). A identificação dos polimorfismos foi realizada através da interpretação dos cromatogramas (Figura 8). Os SNP de cada amostra foram anotados individualmente em uma planilha para as análises posteriores.

Figura 8 - Cromatografia resultante do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Na ilustração, temos a sequência de bases nitrogenadas onde estão localizados os SNP +3187 (R) e +3196 (S). Para o primeiro SNP (R), o indivíduo em questão é heterozigoto (AG, cores verde e preta, respectivamente) enquanto que, para o segundo SNP (S) o indivíduo é homozigoto (CC, cor azul).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

4.6 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Na qual:

x_i^2 é a frequência esperada dos homozigotos do alelo i ;
 $2x_i x_j$ é a frequência esperada do heterozigoto ij ;
 $2x_j^2$ é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada através do programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 4.2 (disponível em <http://genepop.curtin.edu.au/>). Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterozigotos.

No teste exato de probabilidade, o valor de p corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado. O segundo e o terceiro são testes mais sensíveis do que o de probabilidade e utilizam uma hipótese alternativa (H1) de excesso ou de deficiência de heterozigotos, respectivamente.

4.6.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas (x_i) e genotípicas (X_{ii}) de cada *locus*, em casos e controles foram estimadas utilizando-se o GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 4.2 (disponível em <http://genepop.curtin.edu.au/>), de acordo com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad \text{e} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Nas quais:

x_i é a frequência do alelo “i”;
 X_{ii} é a frequência do genótipo “ii”;
 n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;
 n corresponde ao número de indivíduos analisados.

4.6.3 Diferenciação genética das populações

A diferenciação gênica e genotípica entre as populações foi calculada no programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 4.2 (disponível em <http://genepop.curtin.edu.au/>), onde a hipótese nula parte da premissa de que os alelos ou genótipos são retirados de todas as populações de forma idêntica, ou seja, que estes são distribuídos entre todas as populações na mesma proporção.

4.6.4 Análises de Associação

As análises de associação foram verificadas com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador de *Odds Ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se um Intervalo de Confiança (CI) de 95 % e considerando-se $p = 0,05$ como o valor limite de significância (WOOLF, 1955). A OR foi calculada por meio da seguinte equação:

$$OR = (ad)/(bc)$$

Nas quais:

a é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse;

b é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse;

c é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse;

d é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse.

A OR é utilizada para representar o aumento das chances de determinado resultado devido à presença de um fator de risco. Para este teste foi utilizado o *software HDS Epimax Table Calculator* (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2015).

A associação dos alelos e genótipos para todos os polimorfismos foi verificada. Foi realizada, ainda, uma análise de modelos de herança

com o objetivo de fazer uma análise mais apurada dos mecanismos que envolvem o risco da presença e analisar a penetrância do câncer de mama. A penetrância da doença associada com um dado genótipo é o risco da doença em indivíduos portadores desse genótipo. Os modelos de penetrância da doença, que implicam uma relação específica entre genótipo e fenótipo, incluem multiplicativo, aditivo, dominante comum e recessivo comum. Assumindo um parâmetro de penetrância γ ($\gamma > 1$), um modelo multiplicativo indica que o risco da doença é aumentado γ vezes com cada alelo adicional. Um modelo aditivo indica que o risco da doença é aumentado γ vezes para o genótipo heterozigoto e por 2γ vezes para o genótipo homozigoto de risco. Um modelo recessivo comum indica que duas cópias do alelo de risco são necessárias para um aumento γ vezes no risco de doença. O modelo dominante comum indica que ou uma ou duas cópias do alelo de risco são necessárias para um aumento γ vezes no risco de doença (CLARKE et al., 2011).

Alguns dados epidemiológicos (obtidos através de entrevista) foram analisados comparando os grupos casos e controles: índice de massa corpórea (IMC), hábito tabagista atual, menopausa tardia (após os 50 anos), uso de anticoncepcional por 5 anos ou mais e terapia de reposição hormonal (TRH) por 5 anos ou mais.

O dado clínico TNM (obtido do prontuário médico) também foi analisado. O TNM é um tipo de classificação que agrupa casos de câncer de mama de acordo com alguns fatores. Estes grupos refletem a agressividade do tumor. O T significa a extensão do tumor primário, o N o número de linfonodos acometidos e o M a presença de metástase à distância. A avaliação histopatológica do tumor primário (pT) exige a ressecção do tumor primário ou biópsia adequada para avaliar a maior categoria pT. A avaliação histopatológica dos linfonodos regionais (pN) exige a remoção representativa de nódulos para comprovar a ausência de metástase em linfonodos regionais (pN0) e suficiente para avaliar a maior categoria pN. A investigação histopatológica de metástase à distância (pM) exige o exame microscópico. Essas características geram uma classificação de grupos por estádios (0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV) (INCA, 2004).

Foi realizada a análise de associação para os polimorfismos *14 pb In/Del* e *+3142* e para o haplótipo comparando 3 grupos: I, II (IIA e IIB) e III (IIIA, IIIB e IIIC). Os grupos I e II foram analisados com relação ao grupo III.

O dado clínico Grau de Elston e Ellis (obtido do prontuário médico) foi analisado para cada polimorfismo, comparando os grupos I, II e III e a união dos grupos (III *versus* I+II e II+III *versus* I). O Grau de

Elston-Ellis é o sistema de classificação histológica mais amplamente utilizado para o câncer de mama. Refere-se ao sistema Nottingham combinado com grau histológico: sistema de classificação Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (RAKHA et al., 2008). A metodologia foi proposta em 1991, na qual três parâmetros morfológicos são analisados: grau de formação tubular e glandular, grau de pleomorfismo nuclear e uma contagem mitótica. Um somatório de pontos é realizado para definir o grau do tumor em I, II ou III. Pacientes com tumores de grau I possuem uma sobrevida significativamente maior em relação aos que possuem tumores de grau II ou III (ELSTON; ELLIS, 1991).

Os haplótipos e combinações haplotípicas também foram analisadas com a susceptibilidade ao câncer de mama.

4.6.5 Desequilíbrio de Ligação

A análise de desequilíbrio de ligação (do inglês *Linkage Disequilibrium*), combinação não ao acaso de alelos em diferentes *loci*, foi realizada utilizando-se o programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A hipótese nula é a de que a distribuição genotípica em um *locus* é independente da distribuição em outro *locus*. A verificação da ocorrência não aleatória de certas combinações alélicas foi realizada pela seguinte fórmula:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - p_a p_b$$

Nas quais:

Δ_{ab} é o valor do desequilíbrio de ligação;
 p_{ab} é a frequência observada de um haplótipo;
 p_a é a frequência observada do alelo a de um dado locus;
 p_b é a frequência observada do alelo b de um outro locus;
 $p_a p_b$ é a frequência esperada de um haplótipo ab.

O desequilíbrio de ligação pode assumir valores no intervalo de -1,0 a +1,0, sendo que os valores negativos indicam a repulsão entre os alelos em questão, os valores positivos indicam o acoplamento e, o valor zero indica a ausência de desequilíbrio de ligação.

4.6.6 Inferência de Haplótipos

A inferência de haplótipos (h), equivalente à heterozigose em dados diploides, foi estimada considerando a frequência dos haplótipos. As fórmulas da inferência de haplótipos (h) e seu desvio padrão (DP) são:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$DP = \left\{ \frac{2}{n(n-1)} \left[2(n-2) \left[\sum p_i^3 - \left(\sum p_i^2 \right)^2 \right] + \sum p_i^2 - \left(\sum p_i^2 \right)^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Nas quais:

p_i é a frequência do haplótipo i ;

n é o número de cromossomos da amostra;

k é o número de haplótipos.

Os cálculos foram realizados através do programa PHASE (STEPHENS et al., 2001). Para esses cálculos, foram considerados apenas os haplótipos cuja probabilidade foi maior ou igual a 90 %. As amostras que não apresentaram esse valor foram excluídas das análises. As frequências haplotípicas foram calculadas da mesma forma que as alélicas e genotípicas.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra constitui-se de 386 indivíduos, sendo 193 mulheres com câncer de mama, grupo casos, e 193 mulheres sem diagnóstico de câncer de mama, grupo controles, todas residentes em Santa Catarina. Os dois grupos foram pareados de acordo com a idade. Na Tabela 1 estão representadas as características epidemiológicas dos dois grupos.

Tabela 1 - Classificação da amostra, de acordo com a idade, faixa etária e ancestralidade, de mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres sem a doença (controles).

Dados Epidemiológicos	Casos (n=193)	Controles (n=193)
Idade (Média ± SD)	53,06 ± 13,29	53,10 ± 13,65
Faixa etária		
≤ 40 anos	35 (18,13 %)	35 (18,13 %)
> 40 anos	158 (81,87 %)	158 (81,87 %)
Ancestralidade informada		
Euro-descendentes	101 (52,33 %)	121 (62,69 %)
Afro-descendentes	8 (4,14 %)	21 (10,88 %)
Ameríndio-descendentes	2 (1,05 %)	11 (5,70 %)
Outro	4 (2,07 %)	0 (0 %)
Desconhecido	78 (40,41 %)	40 (20,73 %)
Total	193 (100 %)	193 (100 %)

N: número amostral; Média: média entre as amostras; SD: desvio padrão da média.

O grupo casos apresentou uma média de idade de 53,06±13,29 e o grupo controles 53,10±13,65. Foi feita ainda uma classificação de faixa etária dos grupos com a intenção de entender o perfil da mulher com câncer de mama em Santa Catarina. Aproximadamente 19 % das mulheres do grupo casos possui 40 anos ou menos e cerca de 81% possuem mais de 40 anos.

Os indivíduos foram classificados quanto à ancestralidade (dados informados pelos indivíduos). Na classe Euro-descendentes o grupo casos apresentou 52,33 % do total e o grupo controles 62,69 %. A classe

Afro-descendentes totalizou 4,14 % do grupo casos e 10,88 % do grupo controles.

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A partir da análise das sequências de DNA da 3'UTR do gene *HLA-G* de cada amostra, foram identificados os polimorfismos dos dez sítios (14 pb *Del/In*, +3001 *C/T*, +3003 *C/T*, +3010 *G/C*, +3027 *A/C*, +3035 *C/T*, +3142 *G/C*, +3187 *A/G*, +3196 *G/C* e +3227 *A/G*). Com esses dados foi verificada a aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, calculadas as frequências alélicas e genotípicas, as frequências haplotípicas foram inferidas e o desequilíbrio de ligação foi calculado. Além disso, foi testada a diferenciação genética entre os grupos e verificada a associação para os dados genéticos, presença ou ausência dos fatores de risco no grupo casos e dados epidemiológicos nos dois grupos.

5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e frequências alélicas e genotípicas

As distribuições das frequências para os sítios polimórficos da 3'UTR do gene *HLA-G* em casos e controles estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), exceto o *locus* +3003 *C/T* para o grupo de mulheres com câncer de mama ($p = 0,044$) (Tabela 2). Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas de casos e controles estão descritos na Tabela 2.

Para o polimorfismo 14 pb *In/Del* o alelo *Del* foi mais frequente tanto no grupo casos como no grupo controles (0,562 e 0,596 respectivamente). Para o polimorfismo +3001 *C/T* o alelo *C* foi o mais frequente (0,986 em casos e 1,000 em controles). O polimorfismo +3003 *C/T* teve o alelo *T* como o mais frequente nos dois grupos (0,890 em casos e 0,902 em controles). Para o polimorfismo +3010 *G/C* os grupos apresentam frequências bastante diferentes. No grupo casos o alelo mais frequente foi o *C* (0,533) e no grupo controles o *G* foi o mais observado (0,503). Para o polimorfismo +3027 *A/C* o alelo *C* (mais frequente) apresentou a mesma frequência nos dois grupos (0,948). Para o polimorfismo +3035 *C/T* o alelo mais frequente foi o *C* (0,863 em casos e 0,851 em controles). No polimorfismo +3142 *G/C* o alelo mais frequente foi o *G* (0,542 em casos e 0,523 em controles). Para o polimorfismo +3187 *A/G* o alelo mais observado foi o *A* (0,709 em casos e 0,655 em controles). Para o sítio polimórfico +3196 *G/C* o alelo mais frequente foi o *C* (0,712 em casos e 0,719 em controles). No

polimorfismo +3227 A/G o alelo mais frequente foi o G (0,951 em casos e 0,958 em controles).

Tabela 2 - Frequências alélicas e genotípicas para os grupos casos e controles e valor de p para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) estimadas para os 10 sítios de variações polimórficas considerados no presente estudo.

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)
<i>14 pb (rs1704)</i>			0,468			0,548
<i>Del</i>	217	0,562		230	0,596	
<i>In</i>	169	0,438		156	0,404	
Total de Alelos	386			386		
<i>DelDel</i>	64	0,332		66	0,342	
<i>InDel</i>	89	0,461		98	0,508	
<i>InIn</i>	40	0,207		29	0,150	
Total de Indivíduos	192			193		
<i>+3001 (rs567747016)</i>			1,000			SI
<i>C</i>	359	0,986		102	1,000	
<i>T</i>	5	0,014		0	0,000	
Total de Alelos	364			102		
<i>CC</i>	177	0,973		51	1,000	
<i>CT</i>	5	0,027		0	0,000	
<i>TT</i>	0	0,000		0	0,000	
Total de Indivíduos	182			51		

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)
+3003 (rs1707)			0,044*			0,156
<i>C</i>	40	0,110		30	0,098	
<i>T</i>	324	0,890		276	0,902	
Total de Alelos	364			306		
<i>CC</i>	5	0,027		3	0,020	
<i>CT</i>	30	0,165		24	0,157	
<i>TT</i>	147	0,808		126	0,824	
Total de Indivíduos	182			153		
+3010 (rs1710)			0,556			1,000
<i>G</i>	170	0,467		154	0,503	
<i>C</i>	194	0,533		152	0,497	
Total de Alelos	364			306		
<i>GG</i>	42	0,231		39	0,255	
<i>GC</i>	86	0,473		76	0,497	
<i>CC</i>	54	0,297		38	0,248	
Total de Indivíduos	182			153		

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (<i>p</i>)	Controles (n)	Frequência	EHW (<i>p</i>)
+3027 (rs17179101)			1,000			1,000
<i>A</i>	19	0,052		16	0,052	
<i>C</i>	345	0,948		292	0,948	
Total de Alelos	364			308		
<i>AA</i>	0	0,000		0	0,000	
<i>AC</i>	19	0,104		16	0,104	
<i>CC</i>	163	0,896		138	0,896	
Total de Indivíduos	182			154		
+3035 (rs17179108)			0,209			1,000
<i>C</i>	314	0,863		262	0,851	
<i>T</i>	50	0,137		46	0,149	
Total de Alelos	364			308		
<i>CC</i>	133	0,731		111	0,721	
<i>CT</i>	48	0,264		40	0,260	
<i>TT</i>	1	0,005		3	0,019	
Total de Indivíduos	182			154		

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)
+3142 (rs1063320)			0,316			0,748
<i>G</i>	205	0,542		161	0,523	
<i>C</i>	173	0,458		147	0,477	
Total de Alelos	378			308		
<i>GG</i>	59	0,312		43	0,279	
<i>GC</i>	87	0,460		75	0,487	
<i>CC</i>	43	0,228		36	0,234	
Total de Indivíduos	189			154		
+3187 (rs9380142)			0,592			0,093
<i>A</i>	258	0,709		186	0,655	
<i>G</i>	106	0,291		98	0,345	
Total de Alelos	364			284		
<i>AA</i>	93	0,511		56	0,394	
<i>AG</i>	72	0,396		74	0,521	
<i>GG</i>	17	0,093		12	0,085	
Total de Indivíduos	182			142		

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (<i>p</i>)	Controles (n)	Frequência	EHW (<i>p</i>)
+3196 (rs1610696)			0,591			0,784
<i>G</i>	105	0,288		45	0,281	
<i>C</i>	259	0,712		115	0,719	
Total de Alelos	364			160		
<i>GG</i>	13	0,071		7	0,088	
<i>GC</i>	79	0,434		31	0,388	
<i>CC</i>	90	0,495		42	0,525	
Total de Indivíduos	182			80		
+3227 (rs1233331)			1,000			1,000
<i>A</i>	18	0,049		4	0,042	
<i>G</i>	346	0,951		92	0,958	
Total de Alelos	364			96		
<i>AA</i>	0	0,000		0	0,000	
<i>AG</i>	18	0,099		4	0,083	
<i>GG</i>	164	0,901		44	0,917	
Total de Indivíduos	182			48		

Frequências e EHW(GENEPOP); n: número amostral; *p*: probabilidade; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; SI: sem informação. Valores significativos estão anotados com *.

5.2.2 Diferenciação genética das populações

A diferenciação genética entre as populações de casos e controles foi testada a partir dos dez *loci* polimórficos. Nenhum *loci* apresentou resultado significativo em relação à distribuição das frequências gênicas e genotípicas (Tabela 3).

Tabela 3 - Diferenciação gênica e genotípica baseadas nos 10 *loci* estudados.

<i>Loci</i>	Casos x Controles (valores de <i>p</i>)	
	Diferenciação gênica	Diferenciação genotípica
14 pb	0,340	0,366
+3001	0,360	0,359
+3003	0,714	0,725
+3010	0,352	0,355
+3027	0,306	0,292
+3035	0,736	0,730
+3142	0,637	0,656
+3187	0,144	0,132
+3196	0,915	0,917
+3227	0,797	0,795

Diferenciação gênica e genotípica (GENEPOP); *p*: probabilidade.

5.5.3 Análises de Associação

Os resultados obtidos após os cálculos de associação considerando cada *locus* estão descritos na Tabela 4. Foram observadas as seguintes associações significativas para o polimorfismo +3187 A/G: o genótipo AA (OR=1,605; CI 95 % 1,004-2,567; *p*=0,048) e o genótipo AG (OR=0,610; CI 95 % 0,382-0,973; *p*=0,037), ambos destacados na Tabela 4 com asterisco (*).

Tabela 4 - Cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos para cada *locus* averiguado e o desenvolvimento do câncer de mama, com seus respectivos valores de intervalo de confiança (CI 95 %) e de *p*.

Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
<i>14 pb (rs1704)</i>					
<i>Del</i>	217	230	0,871	0,648-1,171	0,382
<i>In</i>	169	156	1,148	0,854-1,544	0,382
Total de Alelos	386	386			
<i>DelDel</i>	64	66	0,955	0,612-1,489	0,915
<i>InDel</i>	89	98	0,830	0,545-1,262	0,415
<i>InIn</i>	40	29	1,478	0,846-2,588	0,184
Total de Indivíduos	192	193			
<i>+300I (rs567747016)</i>					
<i>C</i>	359	102	0,583	0,026-4,940	0,965
<i>T</i>	5	0	1,717	0,202-38,865	0,965
Total de Alelos	364	102			
<i>CC</i>	177	51	0,582	0,025-5,053	0,969
<i>CT</i>	5	0	1,729	0,199-39,612	0,964
<i>TT</i>	0	0	0,284	0,008-10,539	0,929
Total de Indivíduos	182	51			

Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
+3003 (rs1707)					
<i>C</i>	40	30	1,136	0,670-1,929	0,709
<i>T</i>	324	276	0,880	0,519-1,492	0,709
Total de Alelos	364	306			
<i>CC</i>	5	3	1,412	0,289-7,581	0,913
<i>CT</i>	30	24	1,061	0,568-1,985	0,962
<i>TT</i>	147	126	0,900	0,498-1,625	0,818
Total de Indivíduos	182	153			
+3010 (rs1710)					
<i>G</i>	170	154	0,865	0,631-1,186	0,392
<i>C</i>	194	152	1,156	0,843-1,586	0,392
Total de Alelos	364	306			
<i>GG</i>	42	39	0,877	0,516-1,492	0,699
<i>GC</i>	86	76	0,908	0,577-1,428	0,740
<i>CC</i>	54	38	1,277	0,764-2,136	0,388
Total de Indivíduos	182	153			

Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
+3027 (rs17179101)					
<i>A</i>	19	16	1,005	0,484-2,095	1,000
<i>C</i>	345	292	0,995	0,477-2,068	1,000
Total de Alelos	364	308			
<i>AA</i>	0	0	0,847	0,023-31,040	1,000
<i>AC</i>	19	16	0,997	0,478-2,086	1,000
<i>CC</i>	163	138	1,003	0,479-2,092	1,000
Total de Individuos	182	154			
+3035 (rs17179108)					
<i>C</i>	314	262	1,103	0,700-1,737	0,740
<i>T</i>	50	46	0,907	0,576-1,430	0,740
Total de Alelos	364	308			
<i>CC</i>	133	111	1,051	0,632-1,749	0,935
<i>CT</i>	48	40	1,021	0,609-1,713	1,000
<i>TT</i>	1	3	0,278	0,011-3,023	0,501
Total de Individuos	182	154			

Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
+3142 (rs1063320)					
<i>G</i>	205	161	1,082	0,791-1,480	0,663
<i>C</i>	173	147	0,924	0,676-1,264	0,663
Total de Alelos	378	308			
<i>GG</i>	59	43	1,172	0,715-1,921	0,585
<i>GC</i>	87	75	0,898	0,573-1,408	0,701
<i>GG</i>	43	36	0,965	0,565-1,650	0,994
Total de Individuos	189	154			
+3187 (rs9380142)					
<i>A</i>	258	186	1,282	0,906-1,814	0,168
<i>G</i>	106	98	0,780	0,551-1,103	0,168
Total de Alelos	364	284			
<i>AA</i>	93	56	1,605	1,004-2,567	0,048*
<i>AG</i>	72	74	0,610	0,382-0,973	0,037*
<i>GG</i>	17	12	1,116	0,485-2,590	0,935
Total de Individuos	182	142			

Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
+3196 (rs1610696)					
<i>G</i>	105	45	1,036	0,672-1,599	0,950
<i>C</i>	259	115	0,965	0,625-1,487	0,950
Total de Alelos	364	160			
<i>GG</i>	13	7	0,802	0,284-2,329	0,843
<i>GC</i>	79	31	1,212	0,685-2,149	0,570
<i>GG</i>	90	42	0,885	0,505-1,549	0,748
Total de Indivíduos	182	80			
+3227 (rs1233331)					
<i>A</i>	18	4	1,197	0,369-4,289	0,961
<i>G</i>	346	92	0,836	0,233-2,707	0,961
Total de Alelos	364	96			
<i>AA</i>	0	0	0,268	0,007-9,941	0,900
<i>AG</i>	18	4	1,207	0,359-4,463	0,960
<i>GG</i>	164	44	0,828	0,224-2,784	0,960
Total de Indivíduos	182	48			

Análises de associações (HDS Epimax); n: número amostral; OR: *Odds Ratio*; CI: intervalo de confiança; p: probabilidade. Valores significativos estão anotados com *.

Foi realizada a análise de modelos de herança dos polimorfismos (Tabela 5) com o objetivo de realizar uma análise mais apurada dos mecanismos que envolvem o risco da presença desses polimorfismos e o desenvolvimento do câncer de mama.

Encontrou-se uma associação de risco do polimorfismo +3187 A/G utilizando o modelo genético recessivo comum (OR = 1,597; CI 95% 1,031-2,476; $p = 0,035$).

Tabela 5 - Cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos do gene *HLA-G* com modelos de herança e o desenvolvimento do câncer de mama, valores de intervalo de confiança (CI 95 %) e de *p* para OR.

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	14 pb (rs1704)					
	<i>Del</i>	215	230	0,863	0,641-1,161	0,349
	<i>In</i>	169	156	1,159	0,862-1,559	0,349
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times InIn) + (\gamma \times InDel) \text{ versus } DelDel$			1,075	0,698-1,656	0,810
Aditivo	$(2 \times InIn + InDel) \times \gamma \text{ versus } DelDel$			1,134	0,746-1,726	0,605
Recessivo comum	$(InIn \times \gamma) \text{ versus } (InDel + DelDel)$			1,460	0,799-2,674	0,241
Dominante comum	$(InIn + InDel) \times \gamma \text{ versus } DelDel$			1,062	0,688-1,640	0,858
OR alélico	+3001 (rs567747016)	Casos (n)	Controles (n)			
	<i>C</i>	359	102	0,583	0,026-4,940	0,965
	<i>T</i>	5	0	1,717	0,202-38,865	0,965
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times TT) + (\gamma \times CT) \text{ versus } CC$			2,593	0,324-56,715	0,592
Aditivo	$(2 \times TT + CT) \times \gamma \text{ versus } CC$			2,593	0,324-56,715	0,592
Recessivo comum	$(TT \times \gamma) \text{ versus } (CT + CC)$			0,280	0,008-10,397	0,922
Dominante comum	$(TT + CT) \times \gamma \text{ versus } CC$			2,593	0,324-56,715	0,592

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	+3003 (rs1707)					
	C	40	30	1,136	0,670-1,929	0,709
	T	324	276	0,880	0,519-1,492	0,709
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times CC) + (\gamma \times CT) \text{ versus } TT$			1,106	0,633-1,935	0,809
Aditivo	$(2 \times CC + CT) \times \gamma \text{ versus } TT$			1,134	0,665-1,939	0,717
Recessivo comum	$(CC \times \gamma) \text{ versus } (CT + TT)$			1,695	0,370-8,706	0,684
Dominante comum	$(CC + CT) \times \gamma \text{ versus } TT$			1,106	0,633-1,935	0,809
OR alélico	+3010 (rs1710)	Casos (n)	Controles (n)			
	G	170	154	0,865	0,631-1,186	0,392
	C	194	152	1,156	0,843-1,586	0,392
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times CC) + (\gamma \times CG) \text{ versus } GG$			1,248	0,741-2,101	0,450
Aditivo	$(2 \times CC + CG) \times \gamma \text{ versus } GG$			1,182	0,713-1,959	0,574
Recessivo comum	$(CC \times \gamma) \text{ versus } (CG + GG)$			1,266	0,778-2,062	0,376
Dominante comum	$(CC + CG) \times \gamma \text{ versus } GG$			1,140	0,676-1,920	0,693

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	+3027 (rs17179101)					
	A	19	16	1,005	0,484-2,095	1,000
	C	345	292	0,995	0,477-2,068	1,000
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AC) \text{ versus } CC$			1,005	0,472-2,146	1,000
Aditivo	$(2 \times AA + AC) \times \gamma \text{ versus } CC$			1,005	0,472-2,146	1,000
Recessivo comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AC + CC)$			0,846	0,023-31,011	1,000
Dominante comum	$(AA + AC) \times \gamma \text{ versus } CC$			1,005	0,472-2,146	1,000
OR alélico	+3035 (rs17179108)	Casos (n)	Controles (n)			
	C	314	262	1,103	0,700-1,737	0,740
	T	50	46	0,907	0,576-1,430	0,740
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times CC) + (\gamma \times CT) \text{ versus } TT$			3,603	0,332-89,109	0,498
Aditivo	$(2 \times CC + CT) \times \gamma \text{ versus } TT$			3,592	0,333-88,494	0,498
Recessivo comum	$(CC \times \gamma) \text{ versus } (CT + TT)$			1,057	0,640-1,747	0,914
Dominante comum	$(CC + CT) \times \gamma \text{ versus } TT$			3,614	0,333-89,450	0,497

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	+3142 (rs1063320)					
	<i>G</i>	205	161	1,082	0,791-1,480	0,663
	<i>C</i>	173	147	0,924	0,676-1,264	0,663
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times GG) + (\gamma \times CG) \text{ versus } CC$			1,042	0,614-1,767	0,974
Aditivo	$(2 \times GG + CG) \times \gamma \text{ versus } CC$			1,068	0,639-1,784	0,887
Recessivo comum	$(GG \times \gamma) \text{ versus } (CG + CC)$			1,188	0,734-1,923	0,531
Dominante comum	$(GG + CG) \times \gamma \text{ versus } CC$			1,033	0,608-1,756	0,999
OR alélico	+3187 (rs9380142)	Casos (n)	Controles (n)			
	<i>A</i>	258	186	1,282	0,906-1,814	0,168
	<i>G</i>	106	98	0,780	0,551-1,103	0,168
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$			0,925	0,404-2,100	0,994
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$			0,982	0,432-2,214	1,000
Recessivo comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$			1,597	1,031-2,476	0,035*
Dominante comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$			0,892	0,388-2,034	0,922

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	+3196 (rs1610696)					
	<i>G</i>	105	45	1,036	0,672-1,599	0,950
	<i>C</i>	259	115	0,965	0,625-1,487	0,950
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times GG) + (\gamma \times CG) \text{ versus } CC$			1,120	0,644-1,947	0,768
Aditivo	$(2 \times GG + CG) \times \gamma \text{ versus } CC$			1,082	0,636-1,842	0,856
Recessivo comum	$(GG \times \gamma) \text{ versus } (CG + CC)$			0,802	0,284-2,329	0,843
Dominante comum	$(GG + CG) \times \gamma \text{ versus } CC$			1,137	0,652-1,982	0,728
OR alélico	+3227 (rs1233331)	Casos (n)	Controles (n)			
	<i>A</i>	18	4	1,197	0,369-4,289	0,961
	<i>G</i>	346	92	0,836	0,233-2,707	0,961
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$			1,127	0,373-3,631	1,000
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$			1,127	0,373-3,631	1,000
Recessivo comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$			0,264	0,007-9,796	0,893
Dominante comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$			1,127	0,373-3,631	1,000

Análises de associações (HDS Epimax); n: número de alelos; OR: *Odds Ratio*; CI: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. Valores significativos estão anotados com *.

As análises de associação com os dados epidemiológicos considerados, como fatores de risco para o desenvolvimento da doença (Índice de Massa Corpórea (IMC), hábito tabagista, menopausa tardia, uso de anticoncepcional por 5 anos ou mais e uso de terapia de reposição hormonal (TRH) por 5 anos ou mais) estão descritos na Tabela 6.

Foram encontradas associações com os dados de menopausa tardia e uso de anticoncepcional por 5 anos ou mais. A menopausa tardia (50 anos ou mais) foi associada como fator de risco (OR = 2,142; CI 95 % 1,280-3,591; $p = 0,003$) e a menopausa antes dos 50 anos foi associada como fator de proteção para o desenvolvimento do câncer de mama (OR = 0,467; CI 95 % 0,278-0,781; $p = 0,003$). A utilização de anticoncepcional por 5 anos ou mais foi relacionada como fator de risco (OR = 1,560; CI 95 % 0,984-2,477; $p = 0,059$). A não utilização de anticoncepcional por 5 anos ou mais foi relacionada como fator de proteção (OR = 0,641; CI 95 % 0,404-1,017; $p = 0,059$).

Tabela 6 - Classificação epidemiológica da amostra, do grupo casos e do grupo controles e análise de OR para susceptibilidade ao câncer de mama, com seus respectivos valores de CI e *p*.

Dados Epidemiológicos	Casos (n=193)	Controles (n=193)	OR	CI	<i>p</i>
IMC					
<18,5 (baixo peso)	8 (4,37 %)	11 (7,59 %)	0,557	0,198-1,543	0,318
≥18,5 e <25 (adequado)	74 (40,44 %)	50 (34,48 %)	1,290	0,801-2,080	0,323
≥25 e <30 (sobrepeso)	61 (33,33 %)	50 (34,48 %)	0,950	0,584-1,545	0,920
≥30 (obesidade)	40 (21,86 %)	34 (23,45 %)	0,913	0,526-1,587	0,834
Total	183 (100 %)	145 (100 %)			
Hábito tabagista					
Fumante	78 (40,42 %)	56 (36,13 %)	1,199	0,757-1,899	0,480
Não fumante	115 (59,58 %)	99 (63,87 %)	0,834	0,527-1,320	0,480
Total	193 (100 %)	155 (100 %)			
Idade da Menopausa					
≥50 anos	82 (63,08 %)	63 (44,37 %)	2,142	1,280-3,591	0,003*
<50 anos	48 (36,92 %)	79 (55,63 %)	0,467	0,278-0,781	0,003*
Total	130 (100 %)	142 (100 %)			
Uso de anticoncepcional (≥5 anos)					
Sim	70 (37,43 %)	51 (27,72 %)	1,560	0,984-2,477	0,059♦
Não	117 (62,57 %)	133 (72,28 %)	0,641	0,404-1,017	0,059♦
Total	187 (100 %)	184 (100 %)			
Uso de TRH (≥5 anos)					
Sim	9 (4,79 %)	5 (4,9 %)	0,975	0,288-3,452	1,000
Não	179 (95,21 %)	97 (95,1 %)	1,025	0,290-3,467	1,000
Total	188 (100 %)	102 (100 %)			

Análises de associação (HDS Epimax); n: número amostral; OR:*Odds Ratio*; CI: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. Valores significativos estão anotados com * e valores significativos aproximados ($p \approx 0,05$) anotados com ♦.

Os dados clínicos TNM e Grau de Elston e Ellis foram considerados como fatores de risco para a gravidade do câncer de mama. O TNM utilizado neste estudo foi o patológico, onde T é a classificação do tumor primário, N é o número de linfonodos com metástase e M é metástase à distância. As análises com TNM foram realizadas somente para os polimorfismos *14 pb* e *+3142* separadamente e em conjunto (haplótipo) (Tabela 7). Os estádios I e II foram agrupados contra o estágio III. Nenhuma associação foi encontrada.

Tabela 7 - Análises de associação (OR), com seus respectivos valores de CI e *p*, entre o estágio III *versus* os estádios I e II em mulheres com câncer de mama para os polimorfismos *14 pb* e *+3142* da 3'UTR do gene *HLA-G*.

Polimorfismo <i>14 pb</i> (rs1704)	III	I e II	OR	CI	<i>p</i>
<i>Del</i>	8	34	0,941	0,296-2,967	1,000
<i>In</i>	10	40	1,063	0,337-3,375	1,000
Total de alelos	18	74			
<i>DelDel</i>	2	10	0,771	0,092-5,284	1,000
<i>InDel</i>	4	14	1,314	0,240-7,099	1,000
<i>InIn</i>	3	13	0,923	0,150-5,268	1,000
Total de indivíduos	9	37			
Polimorfismo <i>+3142</i> (rs1063320)	III	I e II			
<i>G</i>	10	45	0,694	0,216-2,244	0,682
<i>C</i>	8	25	1,440	0,446-4,634	0,682
Total de alelos	18	70			
<i>GG</i>	3	17	0,529	0,087-2,985	0,657
<i>GC</i>	4	11	1,745	0,310-9,787	0,733
<i>CC</i>	2	7	1,143	0,130-8,454	1,000
Total de indivíduos	9	35			
Haplótipos	III	I e II			
<i>14 pb</i> (rs1704) <i>+3142</i> (rs1063320)					
<i>In/G</i>	10	39	0,994	0,312-3,181	1,000
<i>Del/G</i>	0	6	0,593	0,025-5,616	1,000
<i>Del/C</i>	8	25	1,440	0,446-4,634	0,682
Total de alelos	18	70			
<i>In/G In/G</i>	3	13	0,846	0,137-4,864	1,000
<i>Del/G Del/G</i>	0	0	3,889	0,094-161,734	0,909
<i>Del/C Del/C</i>	2	7	1,143	0,130-8,454	1,000
<i>In/G Del/G</i>	0	4	0,861	0,033-10,452	1,000
<i>In/G Del/C</i>	4	9	2,311	0,400-13,457	0,491
<i>Del/G Del/C</i>	0	2	2,063	0,065-36,066	1,000
Total de indivíduos	9	35			

Análises de associação (HDS Epimax); n: número amostral; OR:Odds Ratio; CI: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

O dado clínico grau histológico combinado de Nottingham (Scarff, Bloom, Richardson modificado por Elston e Ellis) foi considerado, neste estudo, como fator de risco para a gravidade do câncer de mama. A Tabela 8 apresenta as frequências dos grupos (Graus I, II e III).

Tabela 8 - Frequências do dado clínico Grau de Elston e Ellis analisadas em mulheres com câncer de mama.

Grau de Elston e Ellis	Número	Frequência
I	18	15,25 %
II	61	51,70 %
III	39	33,05 %
Total	118	100 %

Os resultados obtidos após as análises de associação, na população de casos, do dado clínico Grau de Elston e Ellis estão representados na Tabela 9. Foi encontrada uma associação aproximada da significância, de risco do polimorfismo +3010 G/C utilizando Grau III *versus* Grau I (OR= 4,063; CI 95 % 0,959-18,478; $p = 0,058$). Outra associação aproximada da significância, encontrada foi do genótipo GC do polimorfismo +3142 G/C. O indivíduo heterozigoto para este polimorfismo teria três vezes mais chances de desenvolver um câncer de mama Grau de Elston e Ellis III, quando comparado com o Grau I (OR= 3,813; CI 95 % 0,976-15,642; $p = 0,055$).

Tabela 9 - Análises de associação (OR) e seus valores de CI e *p*, entre os 3 tipos de Grau de Elston e Ellis (Grau I, Grau II e Grau III) em mulheres com câncer de mama para cada polimorfismo da 3'UTR do gene *HLA-G*.

Polimorfismo 14 pb	G-II	G-I	OR	CI	<i>p</i>
<i>Del</i>	61	17	1,118	0,498-2,510	0,918
<i>In</i>	61	19	0,895	0,398-2,006	0,918
Total de alelos	122	36			
<i>DelDel</i>	16	5	0,924	0,250-3,544	1,000
<i>InDel</i>	29	7	1,424	0,433-4,757	0,705
<i>InIn</i>	16	6	0,711	0,201-2,564	0,770
Total de indivíduos	61	18			
	G-III	G-I			
<i>Del</i>	46	17	1,607	0,674-3,841	0,332
<i>In</i>	32	19	0,622	0,260-1,483	0,332
Total de alelos	78	36			
<i>DelDel</i>	14	5	1,456	0,372-5,905	0,762
<i>InDel</i>	18	7	1,347	0,376-4,898	0,821
<i>InIn</i>	7	6	0,304	0,072-1,270	0,120
Total de indivíduos	39	18			
	G-III	G-II			
<i>Del</i>	46	61	1,438	0,778-2,660	0,274
<i>In</i>	32	61	0,696	0,376-1,285	0,274
Total de alelos	78	122			
<i>DelDel</i>	14	16	1,575	0,606-4,102	0,421
<i>InDel</i>	18	29	0,946	0,391-2,288	1,000
<i>InIn</i>	7	16	0,615	0,201-1,834	0,474
Total de indivíduos	39	61			
	G-III	G-I+G-II			
<i>Del</i>	46	78	1,474	0,822-2,649	0,211
<i>In</i>	32	80	0,678	0,377-1,217	0,211
Total de alelos	78	158			
<i>DelDel</i>	14	21	1,547	0,627-3,810	0,408
<i>InDel</i>	18	36	1,024	0,442-2,371	1,000
<i>InIn</i>	7	22	0,567	0,195-1,600	0,344
Total de indivíduos	39	79			
	G-II+G-III	G-I			
<i>Del</i>	107	17	1,286	0,597-2,773	1,286
<i>In</i>	93	19	0,778	0,361-1,674	1,286
Total de alelos	200	36			
<i>DelDel</i>	30	5	1,114	0,329-3,964	1,000
<i>InDel</i>	47	7	1,394	0,452-4,383	0,704
<i>InIn</i>	23	6	0,597	0,181-2,028	0,522
Total de indivíduos	100	18			

Polimorfismo +3001	G-II	G-I	OR	CI	p
<i>C</i>	111	32	1,697	0,060-24,973	1,000
<i>T</i>	1	0	0,589	0,040-16,768	1,000
Total de alelos	112	32			
<i>CC</i>	55	16	3,438	0,088-134,670	0,954
<i>CT</i>	1	0	0,291	0,007-11,360	0,954
<i>TT</i>	0	0	0,291	0,007-11,360	0,954
Total de individuos	56	16			
	G-III	G-I			
<i>C</i>	71	32	1,109	0,039-16,487	1,000
<i>T</i>	1	0	0,901	0,061-25,798	1,000
Total de alelos	72	32			
<i>CC</i>	35	16	2,188	0,055-86,528	1,000
<i>CT</i>	1	0	0,457	0,012-18,032	1,000
<i>TT</i>	0	0	0,457	0,012-18,032	1,000
Total de individuos	36	16			
	G-III	G-II			
<i>C</i>	71	111	0,640	0,017-23,689	1,000
<i>T</i>	1	1	1,563	0,042-57,906	1,000
Total de alelos	72	112			
<i>CC</i>	35	55	0,636	0,017-24,098	1,000
<i>CT</i>	1	1	1,571	0,041-59,532	1,000
<i>TT</i>	0	0	1,571	0,041-59,532	1,000
Total de individuos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
<i>C</i>	71	143	0,497	0,013-18,353	1,000
<i>T</i>	1	1	2,014	0,054-74,458	1,000
Total de alelos	72	144			
<i>CC</i>	35	71	0,493	0,013-18,594	1,000
<i>CT</i>	1	1	2,029	0,054-76,558	1,000
<i>TT</i>	0	0	2,029	0,054-76,558	1,000
Total de individuos	36	72			
	G-II+G-III	G-I			
<i>C</i>	182	32	1,848	0,073-20,944	1,000
<i>T</i>	2	0	0,541	0,048-13,700	1,000
Total de alelos	184	32			
<i>CC</i>	90	16	2,813	0,096-43,680	0,959
<i>CT</i>	2	0	0,356	0,023-10,438	0,959
<i>TT</i>	0	0	0,174	0,004-6,744	0,706
Total de individuos	92	16			

Polimorfismo +3003	G-II	G-I	OR	CI	p
<i>C</i>	14	3	1,476	0,362-6,944	0,779
<i>T</i>	98	31	0,677	0,144-2,760	0,779
Total de alelos	112	34			
<i>CC</i>	2	0	0,630	0,041-18,555	1,000
<i>CT</i>	10	3	1,014	0,211-5,422	1,000
<i>TT</i>	44	14	0,786	0,151-3,662	1,000
Total de individuos	56	17			
	G-III	G-I			
<i>C</i>	7	3	1,113	0,235-5,881	1,000
<i>T</i>	65	31	0,899	0,170-4,249	1,000
Total de alelos	72	34			
<i>CC</i>	1	0	0,486	0,012-19,097	1,000
<i>CT</i>	5	3	0,753	0,128-4,707	1,000
<i>TT</i>	30	14	1,071	0,179-5,959	1,000
Total de individuos	36	17			
	G-III	G-II			
<i>C</i>	7	14	0,754	0,259-2,136	0,733
<i>T</i>	65	98	1,327	0,468-3,863	0,733
Total de alelos	72	112			
<i>CC</i>	1	2	0,771	0,027-11,493	1,000
<i>CT</i>	5	10	0,742	0,197-2,682	0,831
<i>TT</i>	30	44	1,364	0,413-4,635	0,770
Total de individuos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
<i>C</i>	7	17	0,817	0,290-2,227	0,845
<i>T</i>	65	129	1,224	0,449-3,445	0,845
Total de alelos	72	146			
<i>CC</i>	1	2	1,014	0,036-15,005	1,000
<i>CT</i>	5	13	0,744	0,209-2,528	0,807
<i>TT</i>	30	58	1,293	0,413-4,195	0,822
Total de individuos	36	73			
	G-II+G-III	G-I			
<i>C</i>	21	3	1,331	0,346-5,983	0,885
<i>T</i>	163	31	0,751	0,167-2,889	0,885
Total de alelos	184	34			
<i>CC</i>	3	0	0,573	0,048-14,975	1,000
<i>CT</i>	15	3	0,909	0,206-4,542	1,000
<i>TT</i>	74	14	0,881	0,179-3,805	1,000
Total de individuos	92	17			

Polimorfismo +3010	G-II	G-I	OR	CI	p
<i>G</i>	53	14	1,283	0,552-3,000	0,664
<i>C</i>	59	20	0,779	0,333-1,812	0,664
Total de alelos	112	34			
<i>GG</i>	13	5	0,726	0,187-2,897	0,843
<i>GC</i>	27	4	3,026	0,779-12,668	0,127
<i>CC</i>	16	8	0,450	0,128-1,572	0,260
Total de individuos	56	17			
	G-III	G-I			
<i>G</i>	32	14	1,143	0,463-2,835	0,915
<i>C</i>	40	20	0,875	0,353-2,162	0,915
Total de alelos	72	34			
<i>GG</i>	6	5	0,480	0,101-2,277	0,481
<i>GC</i>	20	4	4,063	0,959-18,478	0,058♦
<i>CC</i>	10	8	0,433	0,110-1,680	0,284
Total de individuos	36	17			
	G-III	G-II			
<i>G</i>	32	53	0,891	0,470-1,685	0,818
<i>C</i>	40	59	1,123	0,593-2,126	0,818
Total de alelos	72	112			
<i>GG</i>	6	13	0,662	0,197-2,154	0,621
<i>GC</i>	20	27	1,343	0,533-3,394	0,635
<i>CC</i>	10	16	0,962	0,342-2,685	1,000
Total de individuos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
<i>G</i>	32	67	0,943	0,514-1,730	0,955
<i>C</i>	40	79	1,060	0,578-1,945	0,955
Total de alelos	72	146			
<i>GG</i>	6	18	0,611	0,192-1,869	0,483
<i>GC</i>	20	31	1,694	0,703-4,100	0,279
<i>CC</i>	10	24	0,785	0,297-2,049	0,748
Total de individuos	36	73			
	G-II+G-III	G-I			
<i>G</i>	85	14	1,227	0,551-2,747	0,724
<i>C</i>	99	20	0,815	0,364-1,815	0,724
Total de alelos	184	34			
<i>GG</i>	19	5	0,625	0,174-2,334	0,629
<i>GC</i>	47	4	3,394	0,932-13,428	0,067
<i>CC</i>	26	8	0,443	0,137-1,434	0,211
Total de individuos	92	17			

Polimorfismo +3027	G-II	G-I	OR	CI	p
A	10	0	3,137	0,386-68,969	0,453
C	102	32	0,319	0,014-2,588	0,453
Total de alelos	112	32			
AA	0	0	0,286	0,007-11,154	0,945
AC	10	0	3,478	0,396-79,576	0,411
CC	46	16	0,288	0,013-2,525	0,411
Total de individuos	56	16			
	G-III	G-I			
A	3	0	1,391	0,121-35,570	1,000
C	69	32	0,719	0,028-8,260	1,000
Total de alelos	72	32			
AA	0	0	0,444	0,011-17,518	1,000
AC	3	0	1,455	0,117-38,844	1,000
CC	33	16	0,688	0,026-8,542	1,000
Total de individuos	36	16			
	G-III	G-II			
A	3	10	0,443	0,093-1,835	0,350
C	69	102	2,255	0,545-10,744	0,350
Total de alelos	72	112			
AA	0	0	1,556	0,041-58,868	1,000
AC	3	10	0,418	0,084-1,841	0,331
CC	33	46	2,391	0,543-11,955	0,331
Total de individuos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
A	3	0	5,826	0,527-145,692	0,240
C	69	134	0,172	0,007-1,897	0,240
Total de alelos	72	134			
AA	0	0	2,000	0,053-75,407	1,000
AC	3	10	0,564	0,114-2,451	0,601
CC	33	62	1,774	0,408-8,792	0,601
Total de individuos	36	72			
	G-II+G-III	G-I			
A	13	0	2,433	0,313-52,215	0,628
C	171	32	0,411	0,019-3,199	0,628
Total de alelos	184	32			
AA	0	0	0,174	0,004-6,744	0,706
AC	13	0	2,633	0,316-58,517	0,589
CC	79	16	0,380	0,017-3,164	0,589
Total de individuos	92	16			

Polimorfismo +3035	G-II	G-I	OR	CI	<i>p</i>
<i>C</i>	92	30	0,613	0,163-2,112	0,565
<i>T</i>	20	4	1,630	0,473-6,148	0,565
Total de alelos	112	34			
<i>CC</i>	36	13	0,554	0,131-2,183	0,521
<i>CT</i>	20	4	1,806	0,458-7,632	0,521
<i>TT</i>	0	0	0,304	0,008-11,812	0,973
Total de individuos	56	17			
	G-III	G-I			
<i>C</i>	59	30	0,605	0,151-2,242	0,589
<i>T</i>	13	4	1,653	0,446-6,625	0,589
Total de alelos	72	34			
<i>CC</i>	24	13	0,615	0,134-2,683	0,685
<i>CT</i>	11	4	1,430	0,324-6,652	0,839
<i>TT</i>	1	0	0,486	0,012-19,097	1,000
Total de individuos	36	17			
	G-III	G-II			
<i>C</i>	59	92	0,987	0,428-2,287	1,000
<i>T</i>	13	20	1,014	0,437-2,334	1,000
Total de alelos	72	112			
<i>CC</i>	24	36	1,111	0,421-2,951	0,992
<i>CT</i>	11	20	0,792	0,294-2,120	0,776
<i>TT</i>	1	0	1,600	0,042-60,596	1,000
Total de individuos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
<i>C</i>	59	122	0,893	0,401-2,005	0,915
<i>T</i>	13	24	1,120	0,499-2,494	0,915
Total de alelos	72	146			
<i>CC</i>	24	49	0,980	0,387-2,493	1,000
<i>CT</i>	11	24	0,898	0,347-2,304	0,979
<i>TT</i>	1	0	2,086	0,055-78,686	1,000
Total de individuos	36	73			
	G-II+G-III	G-I			
<i>C</i>	151	30	0,610	0,169-1,987	0,527
<i>T</i>	33	4	1,639	0,503-5,902	0,527
Total de alelos	184	34			
<i>CC</i>	60	13	0,577	0,145-2,125	0,531
<i>CT</i>	31	4	1,652	0,448-6,594	0,587
<i>TT</i>	1	0	0,187	0,005-7,221	0,739
Total de individuos	92	17			

Polimorfismo +3142	G-II	G-I	OR	CI	p
<i>G</i>	65	21	0,876	0,384-1,987	0,880
<i>C</i>	53	15	1,142	0,503-2,601	0,880
Total de alelos	118	36			
<i>GG</i>	19	8	0,594	0,178-1,987	0,502
<i>GC</i>	27	5	2,194	0,618-8,168	0,280
<i>CC</i>	13	5	0,735	0,193-2,891	0,853
Total de individuos	59	18			
	G-III	G-I			
<i>G</i>	42	21	0,938	0,387-2,265	1,000
<i>C</i>	32	15	1,067	0,442-2,584	1,000
Total de alelos	74	36			
<i>GG</i>	10	8	0,463	0,121-1,755	0,325
<i>GC</i>	22	5	3,813	0,976-15,642	0,055♦
<i>CC</i>	5	5	0,406	0,081-1,995	0,361
Total de individuos	37	18			
	G-III	G-II			
<i>G</i>	42	65	1,070	0,571-2,006	0,938
<i>C</i>	32	53	0,934	0,499-1,750	0,938
Total de alelos	74	118			
<i>GG</i>	10	19	0,780	0,285-2,114	0,757
<i>GC</i>	22	27	1,738	0,698-4,356	0,273
<i>CC</i>	5	13	0,553	0,154-1,896	0,440
Total de individuos	37	59			
	G-III	G-I+G-II			
<i>G</i>	42	86	1,038	0,571-1,887	1,000
<i>C</i>	32	68	0,964	0,530-1,750	1,000
Total de alelos	74	154			
<i>GG</i>	10	27	0,686	0,264-1,758	0,519
<i>GC</i>	22	32	2,063	0,864-4,956	0,111
<i>CC</i>	5	18	0,512	0,150-1,654	0,328
Total de individuos	37	77			
	G-II+G-III	G-I			
<i>G</i>	107	21	0,899	0,411-1,956	0,916
<i>C</i>	85	15	1,112	0,511-2,431	0,916
Total de alelos	192	36			
<i>GG</i>	29	8	0,541	0,174-1,696	0,363
<i>GC</i>	49	5	2,711	0,813-9,531	0,119
<i>CC</i>	18	5	0,600	0,169-2,223	0,578
Total de individuos	96	18			

Polimorfismo +3187	G-II	G-I	OR	CI	p
A	79	24	0,997	0,394-2,489	1,000
G	33	10	1,003	0,402-2,537	1,000
Total de alelos	112	34			
AA	29	9	0,955	0,282-3,218	1,000
AG	21	6	1,100	0,312-3,963	1,000
GG	6	2			1,000
Total de individuos	56	17			
	G-III	G-I			
A	54	24	1,250	0,456-3,400	0,807
G	18	10	0,800	0,294-2,193	0,807
Total de alelos	72	34			
AA	20	9	0,900	0,139-7,252	1,000
AG	14	6	1,167	0,302-4,582	1,000
GG	2	2	0,441	0,039-4,979	0,809
Total de individuos	36	17			
	G-III	G-II			
A	54	79	1,253	0,609-2,589	0,623
G	18	33	0,798	0,386-1,641	0,623
Total de alelos	72	112			
AA	20	29	1,164	0,462-2,941	0,889
AG	14	21	1,061	0,410-2,738	1,000
GG	2	6	0,490	0,064-2,943	0,632
Total de individuos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
A	54	103	1,252	0,631-2,502	0,597
G	18	43	0,798	0,400-1,586	0,597
Total de alelos	72	146			
AA	20	38	1,151	0,479-2,774	0,889
AG	14	27	1,084	0,440-2,665	1,000
GG	2	8	0,478	0,066-2,649	0,571
Total de individuos	36	73			
	G-II+G-III	G-I			
A	133	24	1,087	0,449-2,588	1,000
G	51	10	0,920	0,386-2,228	1,000
Total de alelos	184	34			
AA	49	9	1,013	0,320-3,192	1,000
AG	35	6	1,126	0,343-3,795	1,000
GG	8	2	0,714	0,120-5,405	1,000
Total de individuos	92	17			

Polimorfismo +3196	G-II	G-I	OR	CI	p
<i>G</i>	33	12	0,766	0,316-1,867	0,665
<i>C</i>	79	22	1,306	0,536-3,160	0,665
Total de alelos	112	34			
<i>GG</i>	3	3	0,264	0,037-1,887	0,267
<i>GC</i>	27	6	1,707	0,490-6,100	0,509
<i>CC</i>	26	8	0,975	0,289-3,301	1,000
Total de individuos	56	17			
	G-III	G-I			
<i>G</i>	19	12	0,657	0,250-1,729	0,476
<i>C</i>	53	22	1,522	0,578-3,994	0,476
Total de alelos	72	34			
<i>GG</i>	2	3	0,275	0,028-2,358	0,367
<i>GC</i>	15	6	1,310	0,341-5,120	0,888
<i>CC</i>	19	8	1,257	0,341-4,666	0,925
Total de individuos	36	17			
	G-III	G-II			
<i>G</i>	19	33	0,858	0,419-1,751	0,776
<i>C</i>	53	79	1,165	0,571-2,387	0,776
Total de alelos	72	112			
<i>GG</i>	2	3	1,039	0,114-8,236	1,000
<i>GC</i>	15	27	0,767	0,302-1,941	0,688
<i>CC</i>	19	26	1,290	0,513-3,252	0,703
Total de individuos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
<i>G</i>	19	45	0,805	0,408-1,580	0,604
<i>C</i>	53	101	1,243	0,633-2,454	0,604
Total de alelos	72	146			
<i>GG</i>	2	6	0,657	0,087-3,902	0,912
<i>GC</i>	15	33	0,866	0,357-2,093	0,885
<i>CC</i>	19	34	1,282	0,535-3,082	0,685
Total de individuos	36	73			
	G-II+G-III	G-I			
<i>G</i>	52	12	0,722	0,313-1,680	0,533
<i>C</i>	132	22	1,385	0,595-3,191	0,533
Total de alelos	184	34			
<i>GG</i>	5	3	0,268	0,047-1,617	0,205
<i>GC</i>	42	6	1,540	0,473-5,169	0,599
<i>CC</i>	45	8	1,077	0,342-3,409	1,000
Total de individuos	92	17			

Polimorfismo +3227	G-II	G-I	OR	CI	p
A	2	1	0,600	0,041-17,075	1,000
G	110	33	1,667	0,059-24,534	1,000
Total de alelos	112	34			
AA	0	0	0,304	0,008-11,812	0,973
AG	2	1	0,593	0,038-17,522	1,000
GG	54	16	1,688	0,057-26,358	1,000
Total de indivíduos	56	17			
	G-III	G-I			
A	5	1	2,463	0,260-59,067	0,702
G	67	33	0,406	0,017-3,842	0,702
Total de alelos	72	34			
AA	0	0	0,472	0,012-18,552	1,000
AG	5	1	2,581	0,249-62,425	0,693
GG	31	16	0,388	0,016-4,011	0,693
Total de indivíduos	36	17			
	G-III	G-II			
A	5	2	4,104	0,680-31,472	0,164
G	67	110	0,244	0,032-1,472	0,164
Total de alelos	72	112			
AA	0	0	1,556	0,041-58,868	1,000
AG	5	2	4,355	0,685-34,715	0,156
GG	31	54	0,230	0,029-1,459	0,156
Total de indivíduos	36	56			
	G-III	G-I+G-II			
A	5	3	3,557	0,713-19,426	0,155
G	67	143	0,281	0,051-1,402	0,155
Total de alelos	72	146			
AA	0	0	2,028	0,054-76,441	1,000
AG	5	3	3,763	0,720-21,455	0,147
GG	31	70	0,266	0,047-1,390	0,147
Total de indivíduos	36	73			
	G-II+G-III	G-I			
A	7	1	1,305	0,152-29,612	1,000
G	177	33	0,766	0,034-6,568	1,000
Total de alelos	184	34			
AA	0	0	0,185	0,005-7,142	0,734
AG	7	1	1,318	0,143-30,965	1,000
GG	85	16	0,759	0,032-6,991	1,000
Total de indivíduos	92	17			

Análises de associação (HDS Epimax); n: número amostral; OR: *Odds Ratio*; CI: intervalo de confiança; p: probabilidade. G: Grau de Elston e Ellis. Valores significativos aproximados ($p \approx 0,05$) anotados com ♦.

5.5.4 Desequilíbrio de Ligação

A análise das probabilidades de segregação entre sítios polimórficos foi realizada pelo teste de desequilíbrio de ligação. Os dez sítios polimórficos, considerados par a par, permitiram 45 comparações em ambos os grupos. Foi observado desequilíbrio de ligação ($p \leq 0,05$) entre 30 pares e os outros 15 pares se comportaram como *loci* não ligados ($p > 0,05$). As probabilidades estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Probabilidade (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os dez sítios polimórficos detectados nos grupos casos e controles ($p \leq 0,05$).

Polimorfismos	14 pb InDel	+3001 C/T	+3003 C/T	+3010 G/C	+3027 A/C	+3035 C/T	+3142 G/C	+3187 A/G	+3196 G/C	+3227 A/G
14 pb InDel	-									
+3001 C/T	0,299	-								
+3003 C/T	<0,001*	0,502	-							
+3010 G/C	<0,001*	0,542	<0,001*	-						
+3027 A/C	<0,001*	0,084	0,816	<0,001*	-					
+3035 C/T	0,345	<0,001*	0,210	<0,001*	<0,001*	-				
+3142 G/C	<0,001*	1,000	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	-			
+3187 A/G	<0,001*	0,673	0,002*	<0,001*	0,011*	<0,001*	<0,001*	-		
+3196 G/C	<0,001*	0,668	0,129	<0,001*	0,053♦	<0,001*	<0,001*	<0,001*	-	
+3227 A/G	<0,001*	0,667	0,917	<0,001*	0,061	0,016*	<0,001*	0,148	0,034*	-

Desequilíbrio de ligação (GENEPOP). Valores significativos ($p \leq 0,05$) estão anotados com * e valores significativos aproximados ($p \approx 0,05$) com ♦.

5.5.5 Inferência de haplótipos

Devido ao número reduzido de leituras para os polimorfismos +3001, +3196 e +3227, os quais foram parcialmente sequenciados para o grupo de controles em um trabalho anterior no mesmo grupo de pesquisa (ALMEIDA, 2012), a inferência de haplótipos foi realizada através de métodos probabilísticos levando-se em consideração sete dos dez sítios polimórficos (14 pb In/Del, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T, +3142 C/G e +3187 A/G). O método PHASE foi utilizado para a inferência dos haplótipos e estes foram nomeados de acordo com a literatura existente.

Os haplótipos observados e as suas frequências, em casos e controles, estão descritos com os polimorfismos do *HLA-G* na Tabela 11. Não houve nenhuma associação significativa.

Tabela 11 - Haplótipos inferidos para 3'UTR do *HLA-G*, suas frequências para as populações de casos e controles, análises de associação (OR) entre haplótipos e o desenvolvimento do câncer de mama, valores de *p* e intervalo de confiança (CI).

UTR	Haplótipos	Casos (n=167)	Frequência	Controles (n=125)	Frequência	OR	CI	<i>p</i>
UTR-1	DelTGCCCG	96	28,74 %	86	34,40 %	0,769	0,532-1,111	0,171
UTR-2	InsTCCCGA	100	29,94 %	64	25,60 %	1,242	1,242-1,826	0,289
UTR-3	DelTCCCGA	33	9,88 %	28	11,20 %	0,869	0,494-1,530	0,704
UTR-4	DelCGCCCA	33	9,88 %	26	10,40 %	0,945	0,532-1,681	0,947
UTR-5	InsTCCTGA	26	7,78 %	16	6,40 %	1,235	0,621-2,473	0,632
UTR-6	DelTGCCCA	26	7,78 %	13	5,20 %	1,539	0,741-3,237	0,285
UTR-7	InsTCATGA	19	5,69 %	13	5,20 %	1,100	0,506-2,411	0,942
UTR-8	InsTGCCGA	1	0,30 %	4	1,60 %	0,185	0,008-1,756	0,217
Total de haplótipos		334	100 %	250	100 %			

Análises de associação (HDS Epimax); n: número amostral; OR: *Odds Ratio*; CI: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

Após a inferência dos haplótipos, foi realizada a análise das combinações haplotípicas de cada indivíduo, que são apresentadas na Tabela 12.

Foi encontrada uma associação de proteção próximo à significância para a combinação haplotípica UTR-1+UTR-3 (OR = 0,320; CI 95% 0,094-1,031; $p = 0,057$).

Tabela 12 - Combinações haplotípicas inferidas para 3'UTR do *HLA-G*, suas frequências para as populações de casos e controles, análises de associação (OR) entre as combinações haplotípicas e o desenvolvimento do câncer de mama, valores de intervalo de confiança (CI) e *p*.

Combinações haplotípicas	Casos (n=167)	Frequência	Controles (n=125)	Frequência	OR	CI	<i>p</i>
UTR-1 + UTR-1	14	8,38 %	10	8,00 %	1,052	0,421-2,659	1,000
UTR-1 + UTR-2	30	17,96 %	24	19,20 %	1,104	0,588-2,075	0,858
UTR-1 + UTR-3	5	2,99 %	11	8,80 %	0,320	0,094-1,031	0,057♦
UTR-1 + UTR-4	9	5,39 %	10	8,00 %	0,655	0,236-1,812	0,512
UTR-1 + UTR-5	10	5,99 %	6	4,80 %	1,263	0,408-4,035	0,856
UTR-1 + UTR-6	10	5,99 %	8	6,40 %	0,932	0,327-2,682	1,000
UTR-1 + UTR-7	3	1,80 %	5	4,00 %	0,439	0,081-2,155	0,436
UTR-1 + UTR-8	1	0,60 %	2	1,60 %	0,370	0,013-5,260	0,800
UTR-2 + UTR-2	13	7,78 %	9	7,20 %	1,088	0,418-2,871	1,000
UTR-2 + UTR-3	11	6,59 %	10	8,00 %	0,811	0,308-2,145	0,815
UTR-2 + UTR-4	6	3,59 %	4	3,20 %	1,127	0,274-4,876	1,000
UTR-2 + UTR-5	13	7,78 %	4	3,20 %	2,554	0,750-9,543	0,161
UTR-2 + UTR-6	5	2,99 %	2	1,60 %	1,898	0,320-14,404	0,701
UTR-2 + UTR-7	9	5,39 %	0	0,00 %	7,063	0,900-152,918	0,070
UTR-2 + UTR-8	0	0,00 %	2	1,60 %	0,368	0,013-5,228	0,796

Combinações haplotípicas	Casos (n=167)	Frequência	Controles (n=125)	Frequência	OR	CI	<i>p</i>
UTR-3 + UTR-3	2	1,20 %	0	0,00 %	1,515	0,107-42,113	1,000
UTR-3 + UTR-4	3	1,80 %	4	3,20 %	0,553	0,096-2,990	0,697
UTR-3 + UTR-6	7	4,19 %	0	0,00 %	5,469	0,666-121,604	0,160
UTR-3 + UTR-7	3	1,80 %	3	2,40 %	0,744	0,118-4,702	1,000
UTR-4 + UTR-4	3	1,80 %	2	1,60 %	1,125	0,151-9,769	1,000
UTR-4 + UTR-5	1	0,60 %	1	0,80 %	0,747	0,020-27,431	1,000
UTR-4 + UTR-6	4	2,40 %	1	0,80 %	3,043	0,316-73,714	0,559
UTR-4 + UTR-7	4	2,40 %	2	1,60 %	1,509	0,234-12,089	0,955
UTR-5 + UTR-5	1	0,60 %	2	1,60 %	0,370	0,013-5,260	0,800
UTR-5 + UTR-7	0	0,00 %	1	0,80 %	0,747	0,020-27,431	1,000
UTR-6 + UTR-7	0	0,00 %	2	1,60 %	0,368	0,013-5,228	0,796
Total	167	100 %	125	100 %			

Análises de associação (HDS Epimax); n: número amostral; OR: *Odds Ratio*; CI: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. O valor significativo aproximado ($p \approx 0,05$) está anotado com ♦.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

De acordo com os resultados obtidos no trabalho 82% das mulheres do grupo casos possuem mais de 40 anos. Esse dado está de acordo com INCA (2015), que afirma que o câncer de mama é relativamente raro antes dos 40 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente.

Considerando a ancestralidade (dados informados pelos indivíduos), observou-se um grande número de indivíduos na classe Euro-descendentes nos dois grupos (52,33 % em casos e 62,69 % em controles), que pode ser explicado pelo histórico de colonização do estado de Santa Catarina, que ocorreu predominantemente por europeus (JOCHER, 1997). Na sequência, observou-se uma frequência menor de indivíduos classificados como Afro-descendentes e Ameríndio-descendentes. A presença desses componentes pode ser explicada pelo fato de a população brasileira ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de mistura, principalmente entre indivíduos europeus, africanos e ameríndios (MARRERO et al., 2007; PARRA et al., 2003). É importante ressaltar que muitos indivíduos desconhecem sua ancestralidade, no grupo casos se aproxima de 40 % e no grupo controles de 20 %.

As distribuições das frequências para os sítios polimórficos da 3'UTR do *HLA-G* em casos e controles estão de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), exceto o *locus +3003 C/T* para o grupo casos ($p=0,044$). Esse resultado pode ser explicado como uma variação casual. Somado a isso, nenhum *loci* apresentou resultado significativo em relação a distribuição das frequências gênicas e genotípicas, indicando que não há diferenciação genética entre as populações de casos e controles com os dez sítios polimórficos.

6.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO

Alguns fatores de risco relacionados ao histórico hormonal e reprodutivo das mulheres estão bem estabelecidos quanto às suas contribuições no risco do desenvolvimento do câncer de mama. As mulheres que possuem um histórico de exposição prolongada aos hormônios estrogênio e progesterona possuem um risco elevado de desenvolver a doença. Esses hormônios atuam no estímulo da proliferação celular e, conseqüentemente, podem propiciar o aparecimento ou crescimento de tumores (ACS, 2015; INCA, 2014).

No presente trabalho foram encontrados resultados significativos quando os grupos casos e controles foram comparados com relação a menopausa. A menopausa tardia (50 anos ou mais) foi considerada uma característica de risco (OR = 2,142). Enquanto que menopausa antes dos 50 anos foi considerada uma característica de proteção (OR = 0,467). Os dados estão de acordo com a literatura, as mulheres que terminam seus ciclos reprodutivos muito tarde ficam mais expostas à ação dos hormônios, por isso, a menopausa tardia é considerada um fator de risco para o câncer de mama (ACS, 2015; INCA, 2014).

O uso prolongado de anticoncepcionais e de TRH também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, por causarem o aumento dos níveis hormonais. O risco é elevado nas mulheres que utilizaram anticoncepcionais e TRH por mais de cinco anos (ACS, 2015; INCA, 2014). A utilização de anticoncepcional por 5 anos ou mais apresentou uma associação de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (OR = 1,560), enquanto que a não utilização apresentou-se como um fator de proteção (OR = 0,641). No presente estudo, a análise de associação com o fator TRH não encontrou resultados significativos, e isso pode ser explicado pelo tamanho amostral restrito de mulheres que fazem TRH (9 e 5 mulheres nos grupos casos e controles, respectivamente).

No presente estudo não foi encontrada associação entre o hábito tabagista e o câncer de mama. Os dados da literatura são contraditórios quando discutem essa relação. O hábito de fumar pode ser o responsável por cerca de 20 a 30 % de todos os casos de câncer em geral do mundo (KATZKE et al., 2015). Acredita-se que as toxinas contidas no cigarro possam modular o sistema imune, causando uma redução na quantidade de células NK e assim, diminuindo a imunidade mediada por células (SCOTT et al., 2013). Segundo Johnson (2005) mulheres regularmente expostas ao cigarro apresentaram um aumento no risco de desenvolvimento do câncer de mama, em oposição àquelas que nunca se expuseram ao tabaco. Um estudo feito com quase 80 mil mulheres nos Estados Unidos da América descobriu que fumantes apresentavam um risco 16% maior de desenvolver câncer de mama do que aquelas que nunca fumaram (LUO et al., 2011). Por outro lado, o fumo também apresenta efeitos antiestrogênicos que atuam na redução do risco de câncer de mama (REYNOLDS et al., 2004). Dessa forma, para avaliar a associação do hábito tabagista ao câncer de mama, seria necessária uma análise mais aprofundada considerando a quantidade de cigarros consumidos por dia, exposição passiva e produção hormonal que não foram considerados no presente trabalho.

O efeito da obesidade no risco de desenvolver o câncer de mama apresenta alguns resultados controversos na literatura. A maioria dos estudos apresenta a obesidade como um fator de risco (AHN et al., 2007; BORGQUIST et al., 2009; CHLEBOWSKI et al., 2013; COLDITZ et al., 2006; MATHEW et al., 2008). Em alguns trabalhos a obesidade foi relacionada como uma proteção (CUST et al., 2009; NEMESURE et al., 2009). No presente trabalho, não foram encontradas associações significativas do sobrepeso nem da obesidade com o risco de desenvolvimento do câncer de mama. Uma análise semelhante foi realizada em um outro estudo no Sul do Brasil, no qual, a obesidade também não mostrou relação significativa com o câncer de mama (FELDEN et al., 2011).

Considerando dados genéticos e clínicos para o Grau de Elston-Ellis, quando comparados os grupos III e I encontramos associação de risco nas análises dos polimorfismos +3010 G/C e +3142 G/C. Para o polimorfismo +3010 G/C, os indivíduos que possuem o genótipo heterozigoto GC têm um risco quatro vezes maior de desenvolver um câncer de mama de Grau III quando comparados com os indivíduos homozigotos GG e CC (OR = 4,063). Na associação encontrada para o polimorfismo +3142 G/C, o indivíduo heterozigoto teria quase quatro vezes mais chances de desenvolver um câncer de mama Grau III, quando comparado com os indivíduos homozigotos (OR = 3,813). Não há dados na literatura que comparem esses polimorfismos com Grau de Elston-Ellis.

Para a avaliação do dado clínico de TNM, as mulheres com câncer de mama foram divididas em três grupos (estádios I, II e III). Os estádios I e II foram agrupados e confrontados com o estágio III, para verificar se diferentes estádios apresentariam diferenças com relação aos polimorfismos 14 pb In/Del e +3142 C/G. Nenhuma associação foi encontrada. Isso está de acordo com os dados publicados para uma população do Irã, onde um estudo também não encontrou associação significativa comparando os estádios I, II, III e IV para os polimorfismos (ESKANDARI-NASAB et al., 2013).

Por outro lado, um estudo que comparou os estádios de mulheres com câncer de mama, observou uma associação de risco do alelo Del do polimorfismo 14 pb In/Del para os estádios II e III quando comparados com o estágio I (HAGHI et al., 2015). Outro estudo indicou um aumento dos níveis de sHLA-G em mulheres com câncer de mama quando comparados com indivíduos sem a doença e que este aumento estava relacionado com estádios TNM mais avançados (TNM III e IV) (ZIDI et al., 2016).

Embora o polimorfismo *14 pb In/Del* possa estar associado com o controle da produção de HLA-G, modulando a estabilidade do mRNA, os mecanismos que estão envolvidos nesse processo ainda não estão bem elucidados. Alguns estudos indicaram que o alelo *Del* foi relacionado com a diminuição da expressão (HVIID, et al., 2003; REBMANN et al., 2001; ROUSSEAU et al., 2003;). Isso possivelmente acontece pois, uma fração dos mRNA que apresenta a inserção pode ser adicionalmente processada, ocorrendo a remoção de 92 bases do mRNA maduro. Esse processo resulta em transcritos de HLA-G menores, os quais têm sido relatados como formas mais estáveis da molécula do que os mRNA completos. Porém, outros estudos afirmaram que a presença da inserção foi associada com produção mais baixa da molécula, tanto para isoformas solúveis como para as isoformas ligadas à membrana (DONADI et al., 2011). O polimorfismo *+3142 C/G* também é relacionado com a expressão do *HLA-G*. A presença do alelo *G* diminui a expressão do gene por ser um sítio de ligação para miRNA (TAN et al., 2007; VEIT e CHIES, 2009). Sendo assim, são necessários mais estudos para esclarecer essa relação. É importante ressaltar que no presente estudo o tamanho amostral foi reduzido (46 mulheres com câncer de mama), e isto pode ter influenciado na não associação entre esses dois parâmetros.

Como visto nos resultados, foram encontradas associações para o polimorfismo *+3187 A/G*: o genótipo *AG* como fator de proteção para o câncer de mama (OR = 0,610) e o genótipo *AA* associado como risco para o desenvolvimento da doença (OR = 1,605). Essa última reafirmada pelo modelo de herança recessivo comum (OR = 1,597).

Sabe-se que o polimorfismo *+3187 A/G* se encontra próximo a uma região rica em AU, na qual proteínas interagem e atuam na regulação e estabilidade do mRNA (DONADI et al., 2011; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; MENIER et al., 2010; MOREAU et al., 2009). Bases próximas a essa região podem afetar a ligação de proteínas, degradando o mRNA mais rapidamente e, consequentemente, diminuindo a expressão (CATAMO et al., 2015; PORTO et al., 2015; YIE et al., 2008).

Em um estudo anterior a presença da adenina na posição *+3187* foi associada com a redução da estabilidade do mRNA, que pode levar à redução da expressão de *HLA-G*. O mesmo estudo associou o alelo *A* com pré-eclâmpsia (YIE et al., 2008). O genótipo *GG* foi associado ao aumento nos níveis de sHLA-G e com a diminuição de sobrevida em câncer colorretal (GARZIERA et al., 2015). Esses dados sugerem que o alelo *G* está relacionado com a alta expressão da molécula e vão de

encontro com os dados obtidos no presente estudo, que mostram a presença do genótipo *AA* associada com risco ao câncer de mama, indicando provável alta na expressão de *HLA-G*.

A análise de polimorfismos isolados em regiões curtas e regulatórias, como a 3'UTR do *HLA-G*, pode ser pouco informativa devido ao desequilíbrio de ligação (CASTELLI et al., 2011), pois polimorfismos ligados podem influenciar as análises de associação. Um exemplo disso é que o alelo *In* do polimorfismo *14 pb In/Del* sempre é acompanhado do alelo *G* do *+3142 G/C* e do *A* do *+3187 A/G*. Os alelos *A* e *G* são relacionados com a baixa expressão de *HLA-G*, enquanto o alelo *In* foi associado com alta expressão (HVIID et al., 2003). Dessa forma, a associação do genótipo *AA* ao risco para o desenvolvimento do câncer de mama no presente trabalho pode estar relacionado a ligação dos polimorfismos. Além disso, o polimorfismo *+3187 A/G* tem sido pouco avaliado em estudos de associação com doenças e não há trabalhos com câncer de mama. Pesquisas adicionais poderão esclarecer a associação com a expressão de *HLA-G*, assim como com o câncer de mama.

Foi observado desequilíbrio de ligação ($p \leq 0,05$) entre 30 das 45 possibilidades, indicando a presença de ligação na 3'UTR. Regiões com desequilíbrio precisam ser analisadas de forma mais criteriosa, pois a associação de um determinado polimorfismo pode, na realidade, ser causada por outro, ou outros polimorfismos presentes na região.

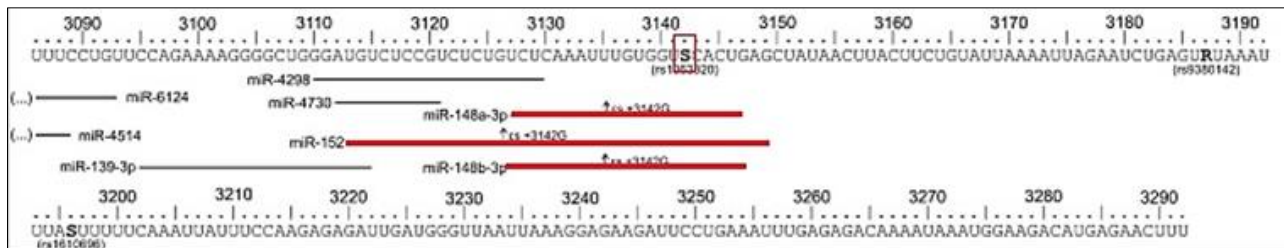
Considerando isso, foi realizada a inferência haplotípica que identificou 8 haplótipos (nomeados de UTR-1 a 8), sendo estes iguais aos descritas como mais frequentes na população brasileira (frequência maior que 1%) (CASTELLI et al., 2010).

No grupo casos a UTR mais frequente foi a UTR-2 (29,94 %) e no grupo controles a UTR-1 (34,40 %). A análise dos haplótipos não mostrou nenhuma associação. Para a combinação haplotípica UTR-1+UTR-3 foi encontrada uma associação de proteção para o desenvolvimento da doença (OR = 0,320).

O haplótipo UTR-1 foi considerado como um haplótipo associado com alta produção da molécula de *HLA-G* (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013) e apresenta altas frequências nas populações mundiais (CASTELLI et al., 2011). Esse haplótipo possui o alelo *Del* no polimorfismo *14 pb In/Del* e o alelo *C* do polimorfismo *+3142*, previamente associados com maior produção de *HLA-G* por alguns estudos (CASTELLI et al., 2011; DONADI et al., 2011; HVIID et al., 2003; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; ROUSSEAU et al., 2003).

Uma das diferenças entre a UTR-1 da UTR-3 é a presença de uma guanina na posição +3142. Essa variação foi associada à susceptibilidade à asma e é justificada pelo aumento da afinidade dessa região com miRNA (miR-148a, miR-148b e miR-152), diminuindo a disponibilidade de mRNA e, conseqüentemente, a expressão de *HLA-G* (TAN et al., 2007). A Figura 9 destaca esses três miRNA e a posição +3142 (em vermelho).

Figura 9 - Alguns miRNA que podem influenciar a expressão do gene *HLA-G* ilustrados. Em destaque os três miRNA que se ligam ao polimorfismo +3142 G/C.



Fonte: adaptado de PORTO et al., 2015.

Vale ressaltar que alguns miRNA vêm sendo estudados como marcadores de diversas doenças e podem ter um potencial terapêutico. Dessa forma, considerando o potencial terapêutico do *HLA-G* como um gene que produz uma molécula imunossupressora natural, a busca por miRNA que possam modular sua expressão é importante. Para entender a biologia do *HLA-G* e suas possíveis interações, faz-se necessário a compreensão dos seus polimorfismos e dos perfis de haplótipos existentes para as diferentes populações.

O haplótipo UTR-1 geralmente é acompanhado de outro haplótipo de baixa produção da molécula de HLA-G. Fisiologicamente, ter dois haplótipos diferentes passa a ser favorável ao indivíduo, que estaria melhor adaptado para responder adequadamente a diferentes situações, como durante a gravidez, transplante, doença autoimune ou câncer (CASTELLI et al., 2011; DONADI et al., 2011). Assim, indivíduos que apresentam alelos para alta e baixa produção da molécula de HLA-G, como a UTR-1 e 3, podem ser beneficiados na modulação do sistema imune. Essa pode ser também a explicação para a associação de proteção encontrada para o genótipo *AG* do polimorfismo +3187 *A/G*, discutida anteriormente.

6.3 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS DE *HLA-G* E CÂNCER DE MAMA

Um número crescente de estudos tem destacado a relevância clínica da expressão do *HLA-G* em determinadas condições patológicas relacionadas à oncologia, incluindo câncer de mama (AMIOT et al., 2011; CAROSELLA et al., 2008; CASTELLI et al., 2008; PAUL et al., 1998; RAMOS et al., 2014; ROUAS-FREISS et al., 2007; SILVA et al., 2013; SIMÕES et al., 2009; SINGER et al., 2003).

Estudos demonstraram um elevado nível ectópico de HLA-G em células de indivíduos com câncer de mama (CHEN et al., 2010; KLEINBERG et al., 2006; SAYED et al., 2010), evidenciando o sHLA-G como potencial biomarcador de associação tumoral para a detecção precoce (HE et al., 2010). Também foi comprovada uma maior expressão de *HLA-G* em tecidos tumorais (ELLIOTT et al., 2011) e a molécula HLA-G foi detectada preferencialmente no tecido tumoral e raramente no tecido normal adjacente (PYO et al., 2006).

Com relação aos polimorfismos, os resultados do estudo de Eskandari-Nasab e colaboradores (2013) associaram o genótipo *DelDel* e o alelo *Del* do polimorfismo *14 pb In/Del* com um risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Adicionalmente, um nível

aumentado de sHLA-G foi observado em indivíduos com o genótipo *DelDel* para o polimorfismo *14 pb In/Del* (ZHENG et al., 2009).

Considerando o polimorfismo *+3142 G/C*, um estudo encontrou associação de proteção do câncer de mama com o genótipo *G/G*. Além disso, foi encontrada uma associação de proteção entre do haplótipo *Del+G (14 pb In/Del e + 3142 G/C*, respectivamente) com o câncer de mama. Esse estudo indicou um aumento dos níveis de sHLA-G em indivíduos com câncer de mama, quando comparados com indivíduos sem a doença (ZIDI et al., 2016).

Uma meta-análise publicada em 2015 utilizou resultados de 12 trabalhos que associaram o polimorfismo *14 pb In/Del* e cânceres em geral. Não foi encontrada relação significativa. Porém, utilizando um subgrupo para o câncer de mama uma associação foi encontrada do alelo *Del* e do genótipo *Del/Del* como fator de risco para o desenvolvimento da doença (LI et al., 2015). Em outra meta-análise com 14 estudos identificou associações de proteção do alelo *In* foi, assim como do genótipo *InIn* (GE et al., 2014).

Devido à importância do gene *HLA-G* no controle da resposta imune e, o quanto o controle da sua expressão se faz necessário em uma série de contextos, a compreensão de como este gene é regulado é importante para o seu uso como ferramenta terapêutica e de diagnóstico. Conhecer as frequências de polimorfismos e de haplótipos do *HLA-G* em uma determinada população pode, por exemplo, elucidar quais miRNA poderiam se ligar a 3'UTR e participar da regulação da sua expressão. Os mecanismos e a biologia desse gene imunomodulador ainda não estão completamente elucidados e estudos funcionais ainda são necessários.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo abordou a análise e a interpretação dos polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* em mulheres com câncer de mama e em mulheres sem evidência de câncer de mama.

Foi realizado um levantamento da variabilidade da 3'UTR do gene *HLA-G* nos dois grupos de mulheres, através do sequenciamento da região. As frequências alélicas, genótípicas, haplotípicas e das combinações de haplótipos encontradas na 3'UTR foram calculadas.

Além disso, investigaram-se as associações entre os alelos, genótipos, haplótipos, combinações haplotípicas, dados epidemiológicos e clínicos com o câncer de mama. As associações encontradas foram: genótipos *AA +3187* como risco e *AG + 3187* como fator de proteção. Considerando os haplótipos, foi encontrada associação de proteção para a combinação UTR-1 + UTR-3. Com relação ao dado clínico Grau de Elston-Ellis houve associação de risco quando comparados os grupos III e I para os genótipos heterozigotos dos polimorfismos *+3010 G/C* e *+3142 G/C*. Os dados foram relacionados com a patogênese do câncer de mama. Considerando os dados epidemiológicos foi encontrada uma associação de risco com a menopausa tardia (50 anos ou mais) e a menopausa antes dos 50 anos foi associada como fator de proteção para o desenvolvimento do câncer de mama. A utilização de anticoncepcional por mais de 5 anos foi relacionada como fator de risco e a não utilização de anticoncepcional por mais de 5 anos foi relacionada como fator de proteção.

De forma geral, este estudo permitiu investigar a possibilidade de associação do gene *HLA-G* ao câncer de mama, relacionando-o tanto com informações epidemiológicas como clínicas. Além disso, este tipo de estudo auxilia na compreensão da patogênese da doença, considerando as condições clínicas heterogêneas, buscando identificar possíveis marcadores genéticos relacionados, apontando para, no futuro, encontrar diagnóstico e tratamentos mais eficientes e diferenciados. Estudos funcionais devem ser realizados para melhor compreender como os polimorfismos genéticos podem agir na patogênese do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2015.

AHN, J.; SCHATZKIN, A.; LACEY, J.V.JR.; ALBANES, D.; BALLARD-BARBASH, R.; ADAMS, K.F.; KIPNIS, V.; MOUW, T.; HOLLENBECK, A.R.; LEITZMANN, M.F. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. **Archives of Internal Medicine**, v.167, p.2091-102, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALMEIDA, B.S. **Polimorfismos do gene HLA-G em pacientes com psoríase**. 2012. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Desenvolvimento – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: 2012.

ALVAREZ, M.; PIEDADE, J.; BALSEIRO, S.; RIBAS, G.; REGATEIRO, F. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. **International journal of immunogenetics**, v.36, n.6, p.361-6, 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Cancer basics**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: janeiro de 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Breast Cancer Facts & Figures 2016-2016**. Atlanta: American Cancer Society, 2015.

AMIOT, L.; FERRONE, S.; GROSSE-WILDE, H.; SELIGER, B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cellular and molecular life sciences**, v.68, n.3, p.417-31, 2011.

APPS, R.; GARDNER, L.; MOFFETT, A. A critical look at HLA-G. **Trends Immunology**, v.29, n.7, p.313-21, 2008.

BEZUHLY, M.; HOWLETT, A.; COLP, P.; CONRAD, D.M.; WALSH, N.; ROWDEN, G.; MORRIS, S.F.; LANGLEY, R.G. Quantitative HLA-G expression in metastasising and non-metastasising

primary thin cutaneous melanomas. **Dermatology**, v.217, n.3, p.281-3, 2008.

BLASCHITZ, A.; GAUSTER, M.; FUCHS, D.; LANG, I.; MASCHKE, P.; ULRICH, D.; KARPFF, E.; TAKIKAWA, O.; SCHIMEK, M. G.; DOHR, G.; SEDLMAYR, P. Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface. **PloS one**, v.6, n.7, p.e21774, 2011.

BORGQUIST, S. JIRSTRÖM, K.; ANAGNOSTAKI, L.; MANJER, J.; LANDBERG, G. Anthropometric factors in relation to different tumor biological subgroups of postmenopausal breast cancer. **International Journal of Cancer**, v.124, p.402-11, 2009.

BREASTCANCER.ORG. **Types of Breast Cancer**. Disponível em: <<http://www.breastcancer.org/symptoms/types>>. Acesso em: dezembro de 2015.

CAMPBELL, E.; ANTONIOU, A.; POWIS, S. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. **Immunology**, v.136, n.4, p.380-4, 2012.

CAO, M.; YIE, S.M.; LIU, J.; YE, S.R.; XIA, D.; GAO, E. Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. **Tissue Antigens**, v.78, n.2, p.120-8, 2011.

CHEN, H.-X.; LIN, A.; SHEN, C.J.; ZHEN, R.; CHEN, B.G.; ZHANG, X.; CAO, F.L.; ZHANG, J.G.; YAN, W.H. Upregulation of human leukocyte antigen-G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. **Human immunology**, v.71, n.9, p.892-8, 2010.

CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v.111, n.10, p.4862-70, 2008.

CAROSELLA, E.D.; GREGORI, S.; ROUAS-FREISS, N.; LEMAULT, J.; MENIER, C.; FAVIER, B. The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis. **Cellular and molecular life sciences**, v.68, n.3, p.353-68, 2011.

CAROSELLA, E. D.; HORUZSKO, A. HLA-G and cancer. **Seminars in cancer biology**, v.17, n.6, p.411-2, 2007.

CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N.; ROUX, D.T.; MOREAU, P. LEMAOULT, J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. **Advances in Immunology**, v.127, p.33-144, 2015.

CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DEGHAIDE, N. H.; DE ALBUQUERQUE, R. S.; MUNIZ, Y. C.; SIMÕES, R. T.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; DONADI, E. A. The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v.11, p.134-41, 2010.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. A Comprehensive Study of Polymorphic Sites along the HLA-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.11, p.3069-86, 2011.

CASTELLI, E C; MENDES-JUNIOR, C. T.; VIANA DE CAMARGO, J. L.; DONADI, E. A. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. **Tissue antigens**, v.72, n.2, p.149-57, 2008.

CASTELLI, E.C.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E.D.; DONADI, E.A. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Human Immunology**, v.70, n.12, p.1020-5, 2009.

CASTELLI, E.C.; RAMALHO, J.; PORTO, I.O.P.; LIMA, T.H.A.; FELÍCIO, L.P.; SABBAGH, A.; DONADI, E.A.; MENDES-JUNIOR, C.T. Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity **Frontiers in immunology**, v.5, p.476, 2014a.

CASTELLI, E.C.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **Journal of Immunology Research**, v.2014, 2014b.

CATAMO, E.; ADDOBBATI. C.; SEGAT, L.; SOTERO FRAGOSO. T.; TAVARES DANTAS, A.; DE ATAIDE MARIZ, H.; FERREIRA DA ROCHA JUNIOR, L.; BRANCO PINTODUARTE, A. L.; COELHO, A. V.; DE MOURA, R. R.; POLESELLO, V.; CROVELLA,

S.; SANDRIN GARCIA, P. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5'urr and 3'utr regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v.85, n.6, p.458-65, 2015.

CHLEBOWSKI, R.T.; MANSON, J.E.; ANDERSON, G.L.; CAULEY, J.A.; ARAGAKI, A.K.; STEFANICK, M.L.; LANE, D.S.; JOHNSON, K.C.; WACTAWSKI-WENDE, J.; CHEN, C.; QI, L.; YASMEEN, S.; NEWCOMB, P.A.; PRENTICE, R.L. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.105, p.526-35, 2013.

CIMINO-MATHEWS, A.; FOOTE, J.B.; EMENS, L.A. Immune targeting in breast cancer. **Oncology**, v.29, n.5, p.375-85, 2015.

CLARKE, G.M.; ANDERSON, C.A.; PETTERSSON, F.H.; CARDON, L.R.; MORRIS, A.P.; ZONDERVAN, K.T. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nature protocols**, v.6, n.2, p.121-33, 2011.

COLDITZ, G.A.; BAER, H.J.; TAMIMI, R.M. Breast cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention**, v.3, p.995-1012, 2006.

COLLINS, R.W. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. **European Journal of Immunogenetics**, v.3, p.105-14, 2004.

CONNOR, A.E.; BAUMGARTNER, K.B.; BAUMGARTNER, R.N.; PINKSTON, C.M. BOONE, S.D.; JOHN, E.M.; TORRES-MEJÍA, G.; HINES, L.M.; GIULIANO, A.R.; WOLFF, R.K.; SLATTERY, M.L. Cigarette Smoking and Breast Cancer Risk in Hispanic and Non-Hispanic White Women: The Breast Cancer Health Disparities Study. **Journal of Women's Health**, 2015.

CROUAU-ROY, B.; AMADOU, C.; BOUISSOU, C.; CLAYTON, J.; VERNET, C.; RIBOUCHON, M.T.; PONTAROTTI, P. Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping. **Genomics**, v.21, n.1, p.241-3, 1994.

CUST, A. E.; STOCKS, T.; LUKANOVA, A.; LUNDIN, E.; HALLMANS, G.; KAAKS, R.; JONSSON, H.; STATTIN, P. The influence of overweight and insulin resistance on breast cancer risk and tumour stage at diagnosis: a prospective study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.113, p.567-76, 2009.

DIAS, F.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; SILVA, M.C.; TRISTÃO, F.S.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; MOREAU, P.; SOARES, E.G.; MENEZES, J.G.; SCHMIDT, A.; DANTAS, R.O.; MARIN-NETO, J.A.; SILVA, J.S.; DONADI, E.A. Human leucocyte antigen-G (HLA-G) and its murine functional homolog Qa2 in the *Trypanosoma cruzi* Infection. **Mediators of Inflammation**, v.2015, 595829, 2015.

DIRAT, B.; BOCHET, L.; ESCOURROU, G.; VALET, P.; MULLER, C. Unraveling the Obesity and Breast Cancer Links: A Role for Cancer-Associated Adipocytes? **Endocrine Development**, v.19, p.45–52, 2010.

DOHERTY, P.C.; ZINKERNAGEL, R.M. A biological role for the major histocompatibility antigens. **Lancet**, v.1, p.1406, 1975.

DONADI, E.A.; CASTELLI, E.C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.68, n.3, p.369-95, 2011.

DOSSUS, L.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; KAAKS, R.; GRAM, I.T.; VILIER, A.; FERVERS, B.; MANJER, J.; TJONNELAND, A.; OLSEN, A.; OVERVAD, K.; CHANG-CLAUDE, J.; BOEING, H.; STEFFEN, A.; TRICHOPOULOU, A.; LAGIOU, P.; SARANTOPOULOU, M.; PALLI, D.; BERRINO, F.; TUMINO, R.; VINEIS, P.; MATTIELLO, A.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; VAN DUJNHOFEN, F.J.; BAKKER, M.F.; PEETERS, P.H.; WEIDERPASS, E.; BJERKAAS, E.; BRAATEN, T.; MENÉNDEZ, V.; AGUDO, A.; SANCHEZ, M.J.; AMIANO, P.; TORMO, M.J.; BARRICARTE, A.; BUTT, S.; KHAW, K.T.; WAREHAM, N.; KEY, T.J.; TRAVIS, R.C.; RINALDI, S.; MCCORMACK, V.; ROMIEU, I.; COX, D.G.; NORAT, T.; RIBOLI, E.; CLAVEL-CHAPELON, F. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. **International journal of cancer**, v.134, n.8, p.1871–88, 2014.

DUFLOTH, R.M.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J.K.; SHINZATO, J.Y.; SANTOS, C.C.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Medical Journal**, v.123, n.4, p.192-7, 2005.

ELLIOTT, R. L.; JIANG, X.P.; PHILLIPS, J.T.; BARNETT, B.G.; HEAD, J.F. Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v.26, n.2, p.153-7, 2011.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v.19, n.5, p.403-10, 1991.

ESKANDARI-NASAB, E.; HASHEMI, M.; HASANI, S.S.; OMRANI, M.; TAHERI, M.; MASHHADI, M.A. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Cancer Biomark**, v.13, n.4, p.253-9, 2013.

FAINARDI, E.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; VAGHI, L.; CASTELLAZZI, M.; MARZOLA, A.; GOVONI, V.; PAOLINO, E.; TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O.R. Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings. **Journal of Neuroimmunology**, v.142, n.1-2, p.149-58, 2003.

FANG, X.; ZHANG, X.; LI, J. Up-regulation of human leukocyte antigen G expression in primary cutaneous malignant melanoma associated with host-vs-tumor immune response. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v.28, n.2, p.219-21, 2008.

FELDEN, J. B. B.; FIGUEIREDO, A. C. L. Distribuição da gordura corporal e câncer de mama: um estudo de caso-controle no Sul do Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.5, p.2425-33, 2011.

FERRARI, P.; LICAJ, I.; MULLER, D.C.; KRAGH ANDERSEN, P.; JOHANSSON, M.; BOEING, H.; WEIDERPASS, E.; DOSSUS, L.; DARTOIS, L.; FAGHERAZZI, G.; BRADBURY, K.E.; KHAW, K.T.; WAREHAM, N.; DUELL, E.J.; BARRICARTE, A.; MOLINA-MONTES, E.; SANCHEZ, C.N.; ARRIOLA, L.; WALLSTRÖM, P.; TJØNNELAND, A.; OLSEN, A.; TRICHOPOULOU, A.; BENETOU, V.; TRICHOPOULOS, D.; TUMINO, R.; AGNOLI, C.; SACERDOTE, C.; PALLI, D.; LI, K.; KAAKS, R.; PEETERS, P.; BEULENS, J.W.; NUNES, L.; GUNTER, M.; NORAT, T.; OVERVAD, K.; BRENNAN,

P.; RIBOLI, E.; ROMIEU I. Lifetime alcohol use and overall and cause-specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC) study. **BMJ open**, v.4, n.7, p.e005245, 2014.

FISCHER, G.F.; MAYR, W.R. Molecular genetics of the HLA complex. **Wien Klin Wochenschr**, v.113, n.20-21, p.814-24, 2001.

GARCIA, C.; WENDT, J.; LYON, L.; JONES, J.; LITTELL, R.D.; ARMSTRONG, M.A.; RAINE-BENNETT, T.; POWELL, C.B. Risk management options elected by women after testing positive for a BRCA mutation. **Gynecologic oncology**, v.132, n.2, p.428–33, 2014.

GARCÍA-OBREGÓN, S.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M.A.; GÓMEZ-PÉREZ, L.; PÉREZ-MIRANDA, A.M.; ARROYO, D.; DE PANCORBO, M.M.; PEÑA, J.A. Microsatellites and Alu elements from the human MHC in Valencia (Spain): analysis of genetic relationships and linkage disequilibrium. **International Journal of Immunogenetics**, v.38, n.6, p.483-91, 2011.

GARZIERA, M.; BIDOLI, E.; CECCHIN, E.; MINI, E3.; NOBILI, S.; LONARDI, S.; BUONADONNA, A.; ERRANTE, D.; PELLA, N.; D'ANDREA, M.; DE MARCHI, F.; DE PAOLI, A.; ZANUSSO, C.; DE MATTIA, E.; TASSI, R.; TOFFOLI, G. HLA-G 3'UTR Polymorphisms Impact the Prognosis of Stage II-III CRC Patients in Fluoropyrimidine-Based Treatment. **PLoS One**, v.10, n.12, p.e0144000, 2015.

GE, Y.Z.; GE, Q.; LI, M.H.; SHI, G.M.; XU, X.; XU, L.W.; XU, Z.; LU, T.Z.; WU, R.; ZHOU, L.H.; WU, J.P.; LIANG, K.; DOU, Q.L.; ZHU, J.G.; LI, W.C.; JIA, R.P. Association between human leukocyte antigen-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and cancer risk: a meta-analysis and systematic review. **Human Immunology**, v.75, n.8, p.827-32, 2014.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, n.24, p.9145-9, 1987.

GOLDBERG, A.C.; RIZZO, L.V. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. **Einstein (São Paulo)**, v.13, n.1, 2015.

HAGHI, M.; HOSSEINPOUR FEIZI, M.A.; SADEGHIZADEH, M.; LOTFI, A.S. 14-bp Insertion/Deletion Polymorphism of the HLA-G

gene in Breast Cancer among Women from North Western Iran. **Asian Pacific Journal Cancer Prevention**, v.16, n.14, p.6155-8, 2015.

HAMMER, A.; HUTTER, H.; DOHR, G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.38, p.150-7, 1997.

HE, X.; DONG, D.D.; YIE, S.M.; YANG, H.; CAO, M.; YE, S.R.; LI, K.; LIU, J.; CHEN, J. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on alloctytotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. **Annals of surgical oncology**, v.17, n.5, p.1459-69, 2010.

HEALTH DECISION STRATEGIES. **EpiMax Table Calculator**. Disponível em: <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso em: novembro de 2015.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R.C.; BRUFORD, E.A.; KHODIYAR, V.K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT JÚNIOR, C.C.; WRIGHT, M.W.; WAIN, H.M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v.5 n.12, p.889-99, 2004.

HU, J.; LI, L.; LIU, Y.; CHEN, Y.; LIU, C.; LIANG, W.; ZHAO, J.; ZOU, H.; CUI, X.; QI, Y.; LI, L.; FENG, L. Overexpression of HLA-G Is positively associated with Kazakh esophageal squamous cell carcinoma in Xinjiang, China. **Viral Immunology**, v.26, n.3, p.180-4, 2013.

HVIID, T.V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v.12, n.3, p. 209-32, 2006.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; RØRBYE, C.; NIELSEN, L.G. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v.55, n.2, p.63-79. 2003.

IBRAHIM, E.C.; ARACTINGI, S.; ALLORY, Y.; BORRINI, F.; DUPUY, A.; DUVILLARD, P.; CAROSELLA, E.D.; AVRIL, M.F.; PAUL, P. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration

and HLA-A1 genotype. **International Journal of Cancer**, v.108, n.2, p.243-50, 2004.

INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECT (IMGT/HLA Database). Disponível em: <
<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> >. Acesso em: janeiro de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: 118 p., 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **TNM: classificação de tumores malignos**. Rio de Janeiro, 2004.

JEONG, S.; PARK, S.; PARK, B.W.; PARK, Y.; KWON, O.J.; KIM, H.S. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. **PLoS One**, v.9, n.5, 2014.

JOCHEM, T.V. **A epopéia de uma imigração**. Água Mornas: edição do autor, 1997.

JOHNSON, K.C. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v.117, p.619-28, 2005.

KAMISHIKIRYO, J.; MAENAKA, K. HLA-G molecule. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, n.28, p.3318-24, 2009.

KATZKE, V.A.; KAAKS, R.; KÜHN, T. Lifestyle and cancer risk. **Cancer Journal**, v.21, n.2, p.104-10, 2015.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v.343, n.10, p.702-9, 2000.

KLEINBERG, L.; FLØRENES, V.A.; SKREDE, M. DONG, H.P.; NIELSEN, S.; MCMASTER, M.T.; NESLAND, J.M.; SHIH, I. DAVIDSON, B. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and

clinically aggressive breast carcinoma. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v.449, n.1, p.31-9, 2006.

KREN, L.; SLABY, O.; MUCKOVA, K.; LZICAROVA, E.; SOVA, M.; VYBIHAL, V.; SVOBODA, T.; FADRUS, P.; LAKOMY, R.; VANHARA, P.; KRENOVA, Z.; STERBA, J.; SMRCKA, M.; MICHALEK, J. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance? **Neuropathology**, v.31, n.2, p.129-34, 2011.

KRUIJF, E.M.; SAJET, A.; VAN NES, J.G.; NATANOV, R.; PUTTER, H.; SMIT, V.T.; LIEFERS, G.J.; VAN DEN ELSEN, P.J.; VAN DE VELDE, C.J.; KUPPEN, P.J. HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. **Journal Immunology**, v.185, n.12, 7452-9, 2010.

KUERSTEN, S.; GOODWIN, E. B. The power of the 3' UTR: translational control and development. **Nature reviews. Genetics**, v.4, n.8, p.626-37, 2003.

LARSEN, M.J.; THOMASSEN, M.; GERDES, A.M.; KRUSE, T.A. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast Cancer**, v.8, p.145-55, 2014.

LARSEN, M.H.; HVIID, T. V. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human Immunology**, v.70, n.12, p.1026-34, 2009.

LE PAGE, M.E.; GOODRIDGE, J.P.; JOHN, E.; CHRISTIANSEN, F.T.; WITT, C.S. Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- γ responses to soluble HLA-G preparations. **Journal Immunology**, v.192, n.2, p.732-40, 2014.

LEFEBVRE, S.; ANTOINE, M.; UZAN, S.; MCMASTER, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. **The Journal of Pathology**, v.196, n.3, p.266-74, 2002.

LEWIN, B. **Genes IX**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

LI, T.; HUANG, H.; LIAO, D.; LING, H.; SU, B.; CAI, M. Lack of association between the HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del polymorphism and cancer risk: A meta-analysis of case-control study. **Human Immunology**, 2015.

LIN, A.; CHEN, H.X.; ZHU, C.C.; ZHANG, X.; XU, H.H.; ZHANG, J.G.; WANG, Q.; ZHOU, W.J.; YAN, W.H. Aberrant human leukocyte antigen-G expression and its clinical relevance in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.14, n.8, p.2162-71, 2010.

LIN, A.; ZHANG, X.; ZHOU, W.J.; RUAN, Y.Y.; XU, D.P.; WANG, Q.; YAN, W.H. Human leukocyte antigen-G expression is associated with a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v.129, n.6, p.1382-90, 2011.

LOKATE, M.; STELLATO, R.K.; VELDHUIS, W.B.; PEETERS, P.H.; VAN GILS, C.H. Age-related changes in mammographic density and breast cancer risk. **American journal of epidemiology**, v.178, n.1, p.101-9, 2013.

LUO, J.; MARGOLIS, K.L.; WACTAWSKI-WENDE, J.; HORN, K.; MESSINA, C.; STEFANICK, M.L.; TINDLE, H.A.; TONG, E.; ROHAN, T.E. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. **BMJ**, v.342, p.d1016, 2011.

MARRERO, A.R.; BRAVI, C.; STUART, S.; LONG, J.C.; PEREIRA-DAS-NEVES, L.F.; KOMMERS, T.; CARVALHO, C.M.; PENA, S.D.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. Pre-and post Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. **Human Hereditary**, v.64, p.160-71, 2007.

MARTELLI-PALOMINO, G.; PANCOTTO, J.A.; MUNIZ, Y.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; CASTELLI, E.C.; MASSARO, J.D.; KRAWICE-RADANNE, I.; PORAS, I.; REBMANN, V.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential HLA-G soluble levels in the Brazilian and French population. **PLoS One**, v.8, p.e71742, 2013.

MATHEW, A.; GAJALAKSHMI, V.; RAJAN, B.; KANIMOZHI, V.; BRENNAN, P.; MATHEW, B.S.; BOFFETTA, P. Anthropometric factors and breast cancer risk among urban and rural women in South India: a multicentric casecontrol study. **British Journal of Cancer**, v.99, p.207-13, 2008.

MEHRA, N.K.; KAUR, G. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. **Cambridge University Press**, v.5, 2003.

MENIER, C.; RITEAU, B.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N. MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. **International Journal of Cancer**, v.100, p.63–70, 2002.

MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; FAVIER, B.; LEMAULT, J.; MOREAU, P.; CAROSELLA, E.D. Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. **Tissue antigens**, v.75, n.3, p.201-6, 2010.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.3, p.1215, 1988.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular Epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research**, v.544, n.1, p.9–41, 2003.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E.D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, n.9B, p.2973-89, 2009.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. **What is cancer?** United States of America, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>>. Acesso em: janeiro de 2016.

NEMESURE, B.; WU, S.Y.; HAMBLETON, I.R.; LESKE, M.C.; HENNIS, A.J.; BARBADOS NATIONAL CANCER STUDY GROUP. Risk factors for breast cancer in a black population – the Barbados National Cancer Study. **International Journal Cancer**, v.124, p.174-9, 2009.

PARHAM, P.; NORMAN, P.J.; ABI-RACHED, L.; GUETHLEIN, L.A. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.367, p.800-11, 2012.

PARK, Y.; PARK, Y.; LIM, H.S.; KIM, Y.S.; HONG, D.J.; KIM, H.S. Soluble human leukocyte antigen-G expression in hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma. **Tissue Antigens**, v.79, n.2, p.97-103, 2012.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, JR.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D.J. Color and genomic ancestry in brazilians. **PNAS**, v.100, n.1, p.177-82, 2003.

PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; MOREAU, P.; RITEAU, B.; LE GAL, F.A.; AVRIL, M.F.; DAUSSET, J.; GUILLET, J.G.; CAROSELLA, E.D. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.8, p.4510-5, 1998.

PORTO, I. O.; MENDES-JUNIOR, C. T.; FELÍCIO, L. P.; GEORG, R. C.; MOREAU, P.; DONADI, E. A.; CHIES, J. A.; CASTELLI, E. C. MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. **Molecular Immunology**, v.65, n.2, p.230-41, 2015.

PYO, C.W.; WILLIAMS, L.M.; MOORE, Y.; HYODO, H. LI, S.S.; ZHAO, L.P.; SAGESHIMA, N.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. **Immunogenetics**, v.58, n.4, p.241-51, 2006.

QUANTE, A. S.; WHITTEMORE, A.S.; SHRIVER, T.; STRAUCH, K.; TERRY, M.B. Breast cancer risk assessment across the risk continuum: genetic and nongenetic risk factors contributing to differential model performance. **Breast cancer research : BCR**, v.14, n.6, p.R144, 2012.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E.O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural

killer cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.7, p.1093-100, 1999.

RAKHA, E.A.; EL-SAYED, M.E.; LEE, A.H.; ELSTON, C.W.; GRAINGE, M.J.; HODI, Z.; BLAMEY, R.W.; ELLIS, I.O. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, n.19, p.3153-8, 2008.

RAMOS, C.S.; GONÇALVES, A.S.; MARINHO, L.C.; GOMES AVELINO, M.A.; SADDI, V.A.; LOPES, A.C.; SIMÕES, R.T.; WASTOWSKI, I.J. Analysis of HLA-G gene polymorphism and protein expression in invasive breast ductal carcinoma. **Human Immunology**, v.75, n.7, p.667-72, 2014.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-9, 1995.

REBMANN, V.; VAN DER VEN, K. PASSLER, M.; PFEIFFER, K.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**, v.57, p.15, 2001.

REYNOLDS, P.; HURLEY, S.; GOLDBERG, D. E.; ANTON-CULVER, A.; BERNSTEIN, L.; DEAPEN, D.; HORN-ROSS, P. L.; PEEL, D.; PINDER, R.; ROSS, R. K.; WEST, D.; WRIGHT, W. E.; ZIOGAS, A. Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California teachers study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.96, n.1, p.29-37, 2004.

RITTE, R.; TIKK, K.; LUKANOVA, A.; TJØNNELAND, A.; OLSEN, A.; OVERVAD, K.; DOSSUS, L.; FOURNIER, A.; CLAVEL-CHAPELON, F.; GROTE, V.; BOEING, H.; ALEKSANDROVA, K.; TRICHOPOULOU, A.; LAGIOU, P.; TRICHOPOULOS, D.; PALLI, D.; BERRINO, F.; MATTIELLO, A.; TUMINO, R.; SACERDOTE, C.; QUIRÓS, J.R.; BUCKLAND, G.; MOLINA-MONTES, E.; CHIRLAQUE, M.D.; ARDANAZ, E.; AMIANO, P.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; VAN GILS, C.H.; PEETERS, P.H.; WAREHAM, N.; KHAW, K.T.; KEY, T.J.; TRAVIS, R.C.; WEIDERPASS, E.; DUMEAUX, V.; LUND, E.; SUND, M.; ANDERSSON, A.; ROMIEU, I.; RINALDI, S.; VINEIS, P.; MERRITT, M.A.; RIBOLI, E.; KAAKS, R. Reproductive factors and risk of hormone receptor positive and

negative breast cancer : a cohort study. **BMC cancer**, v.13, p.1–12, 2013.

RIZZO, R.; BORTOLOTTI, D.; FREDJ, N.B.; ROTOLA, A.; CURA, F.; CASTELLAZZI, M.; TAMBORINO, C.; SERACENI, S.; BALDI, E.; MELCHIORRI, L.; TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O.R.; FAINARDI E. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Human immunology**, p.5-11, 2012.

ROBINSON, J.; WALLER, M. J.; PARHAM, P.; BODMER, J. G.; MARSCH, S. G. E. IMGT/HLA Database – a sequence database for the human major histocompatibility complex. **Nucleic Acid Research**, v.29, n.1, p.210-3, 2001.

ROLFSEN, G.B.; CASTELLI, E.C.; DONADI, E.A.; DUARTE, R.A.; SOARES, C.P. HLA-G polymorphism and breast cancer. **International Journal of Immunogenetics**, v.41, n.2, p.143-8, 2014.

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human Immunology**, v.64, n.11, p.1005-10, 2003.

ROUAS-FREISS, N.; GONÇALVES, R.M.B.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.11520–5, 1997.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LEMAULT, J.; CAROSELLA, E.D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Seminars in cancer biology**, v.17, n.6, p.413-21, 2007.

SAYED, D.; BADR, G.; MAXIMOUS, D.; MIKHAIL, N.N.; ABU-TARBOUSH, F.; ALHAZZA, I.M. HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. **Tissue antigens**, v.75, n.1, p.40-7, 2010.

SCOTT, I. C.; SEGOBIN, S. D.; STEER, S.; TAN, R.; FORABOSCO, P.; HINKS, A.; EYRE, S.; MORGAN, A. W.; WILSON, A. G.;

HOCKING, L. J.; WORDSWORTH, P.; BARTON, A.; WORTHINGTON, J.; COPE, A. P.; LEWIS, C. M. Predicting the Risk of Rheumatoid Arthritis and Its Age of Onset through Modelling Genetic Risk Variants with Smoking. **PLoS Genetics**, v.9, n.9, 2013.

SHIROISHI, M.; KUROKI, K.; OSE, T.; RASUBALA, L.; SHIRATORI, I.; ARASE, H.; TSUMOTO, K.; KUMAGAI, I.; KOHDA, D.; MAENAKA, K. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfidelinked HLA-G dimer. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.15, p.10439-47, 2006.

SILVA, I.D.; MUNIZ, Y.C.; SOUSA, M.C.; SILVA, K.R.; CASTELLI, E.C.; FILHO, J.C.; OSTA, A.P.; LIMA, M.I.; SIMÕES, R.T. HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervico-vaginal cancer. **Human Immunology**, v.74, n.4, p.452-8, 2013.

SIMÕES, R.T.; GONÇALVES, M.A.; CASTELLI, E.C.; JÚNIOR, C.M.; BETTINI, J.S.; DISCORDE, M.L.; DUARTE, G. QUINTANA, S.M.; SIMÕES, A.L.; MOREAU, P.; CAROSELLA, E.D.; SOARES, E.G.; DONADI, E.A. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. **Modern Pathology**, v.22, n.8, p.1075-82, 2009.

SINGER, G.; REBMANN, V.; CHEN, Y.C.; LIU, H.T.; ALI, S.Z.; REINSBERG, J.; MCMASTER, M.T.; PFEIFFER, K.; CHAN, D.W.; WARDELMANN, E.; GROSSE-WILDE, H.; CHENG, C.C.; KURMAN, R.J.; SHIH, I. HLA-G Is a Potential Tumor Marker in Malignant Ascites. **Clinical Cancer Research**, v.9, n.12, p. 4460-4, 2003.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **The America Journal of Human Genetics**, v.68, p.978-89, 2001.

TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BROCKMANSCHNEIDER, R.; PAN, L.; SOLWAY, J.; GERN, J. E.; LEMANSKE, R. F.; NICOLAE, D.; OBER, C. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. **The American Journal of Human Genetics**, v.82, n.1, p.251, 2007.

THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. **Nature**, v.401, n.6756, 1999.

THORSBY, E. A short history of HLA. **Tissue Antigens**, v.74, n.2, p.101-16, 2009.

TORRE, L.A.; BRAY, F.; SIEGEL, R.L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.65, n.2, p.87-108, 2015.

VEIT, T. D.; CHIES, J. A B. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transplant immunology**, v.20, n.4, p.229-31, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Obesity and Overweight**. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: janeiro de 2016.

WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, v.19, n.4, p. 251-3, 1955.

YE, S.R.; YANG, H.; LI, K.; DONG, D.D.; LIN, X.M.; YIE, S.M. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. **Modern Pathology**, v.20, n.3, p.375-83, 2007.

YIE, S.M.; LI, L.H.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. **Molecular Human Reproduction**, v.14, p.649-53, 2008.

YIE, S.M.; YANG, H.; YE, S.R.; LI, K.; DONG, D.D.; LIN, X.M. Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v.58, n.2, p.267-74, 2007.

ZEESTRATEN, E.C.; REIMERS, M.S.; SAADATMAND, S.; DEKKER, J.W.; LIEFERS, G.J.; van den ELSEN, P.J.; van de VELDE, C.J.; KUPPEN, P.J. Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. **British Journal of Cancer**, v.110, n.2, p.459-68, 2014.

ZHENG, J.; XU, C.; CHU, D.; ZHANG, X.; LI, J.; JI, G.; HONG, L.; FENG, Q.; LI, X.; WU, G.; DU, J.; ZHAO, Q. Human leukocyte antigen G is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis. **Immunology Letters**, v.161, n.1, p.13-9, 2014.

ZHENG, X.Q.; ZHU, F.; SHI, W.W.; LIN, A.; YAN, W.H. The HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism is a putative susceptible factor for active humancytomegalovirus infection in children. **Tissue Antigens**, v.74, n.4, p.317-21, 2009.

ZIDI, I.; DZIRI, O.; ZIDI, N.; SEBAI, R.; BOUJELEBENE, N.; BEN HASSINE, A.; BEN YAHIA, H.; LAARIBI, A.B.; BABAY, W.; RIFI, H.; MEZLINI, A.; CHELBI, H. Association of HLA-G +3142 C>G polymorphism and breast cancer in Tunisian population. **Immunologic Research**, 2016.

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) indivíduos-controles

Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

Projetos de Pesquisa: “Câncer de Mama: busca de miRNAs que controlam a expressão de *HLA-G*, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnósticos e opções terapêuticas”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina”

Informações: Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos: Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas. Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto. Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

Riscos: A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos: Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios: Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de Mama: busca de miRNAs que controlam a expressão de *HLA-G*, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnósticos e opções terapêuticas”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, ___/___/_____

Assinatura: _____ RG: _____

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) indivíduos com câncer de mama

**Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Laboratório de Polimorfismos Genéticos**

Projeto de Pesquisa: “Câncer de Mama: busca de miRNAs que controlam a expressão de HLA-G, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnósticos e opções terapêuticas”

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama. Para isso, pedimos a sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, onde estão as informações de suas características biológicas). O DNA extraído será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns dos genes propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo, ao reparo de DNA, etc.) e o aparecimento dessa doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em projetos futuros aprovados pelo sistema CEP/CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, e que não haverá influência no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer ou esclarecer qualquer dúvida que porventura apareça. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Dra. Ilíada Rainha de Souza e com a Dra. Yara Costa Netto Muniz.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 15 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc. Também precisaremos de um pedacinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e coletar um pouco de sangue em uma seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte desse estudo.

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto ao participar dessa pesquisa, mas os resultados desse estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, beneficiando assim muitas outras pessoas.

Florianópolis, _____ de _____ de _____.

Nome e Assinatura do responsável:

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de Mama: busca de miRNAs que controlam a expressão de *HLA-G*, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnósticos e opções terapêuticas”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, ___/___/_____

Assinatura: _____ RG: _____

ANEXO C – Questionário indivíduos-controles

**Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Laboratório de Polimorfismos Genéticos**

Dados Pessoais:

Data: __/__/__

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: _____ Sexo: () M () F

Data de nascimento: _____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade:

() analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo

() 2º grau incompleto () 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência: Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente

() Asiático descendente () Indígena descendente

Cor da pele: () negra () mulata () amarela () branca

Observações:

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência do pai: Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Possui filhos: () Sim () Não Quantos: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? () Sim () Não

Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200 mL): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? () Sim () Não

Tipo: _____

Quantidade: () menos de 30 min () 30 min () 1h () mais de 1 h

Frequência: () 1x semana () 2-3x semana () 4-6x semana

() Todo os dias () Menos de 1x semana

Você **FUMA**? () Sim () Não Você já **FUMOU**? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª gestação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total (meses): _____

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? () Sim () Não Já utilizou AC? () Sim () Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: _____

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? () Sim () Não Já fez TRH? () Sim () Não

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações _____

Histórico Médico

Caso de **CÂNCER** pessoal? () Sim () Não

Tipo: _____

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: () filha () irmã () mãe () avó

() tia materna 1º grau () tia paterna 1º grau

() prima materna 1º grau () prima paterna 1º grau

() Outros _____

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? () Sim () Não

Local: _____

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? () Sim () Não

Qual? _____

Tempo de diagnóstico: _____

Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? () Sim () Não

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: () Sim () Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: () Sim () Não

OSTEOPOROSE: () Sim () Não

DOENÇA REUMÁTICA: () Sim () Não

DIABETES: () Sim () Não

ASMA: () Sim () Não

HIV: () Sim () Não () Nunca fez exame

HEPATITE: () Sim () Não () Nunca fez exame

DENGUE: () Sim () Não

TUBERCULOSE: () Sim () Não

DISTÚRPIO RENAL: () Sim () Não

DISTÚRPIO PULMONAR: () Sim () Não

DISTÚRPIO HEPÁTICO: () Sim () Não

Casos de **DOENÇA DE ALZHEIMER** na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

Casos de **DOENÇA DE PARKINSON** na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS? _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve **DEPRESSÃO**? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

ANEXO D – Questionário de indivíduos com câncer de mama

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

IDENTIFICAÇÃO

Data: __/__/__ **Coleta:** (). SANGUE (). TUMOR
 ENTREVISTADOR _____ MÉDICO
 RESPONSÁVEL _____
 HOSPITAL _____

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: _____ Sexo: (). M (). F

Data de nascimento: _____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: (). Sim (). Não

Escolaridade: (). analfabeto (). 1º grau incompleto

(). 1º grau completo (). 2º grau incompleto

(). 2º grau completo (). superior incompleto

(). superior completo (). pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência:

Materna _____ Paterna _____

Etnia: (). Euro descendente (). Afro descendente

(). Asiático descendente (). Indígena descendente

Cor da pele: (). negra (). mulata (). amarela (). branca

Observação: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência do pai:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: (). Sim (). Não Quantos: _____

Possui filhos: (). Sim (). Não Quantos: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? (). Sim (). Não

Frequência: (). Todos os dias (). Fim de semana (). Esporadicamente (Festas).

Quantidade (copos 200 mL): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

(). Cerveja (). Vinho (). Cachaça (). Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

(). Cerveja (). Vinho (). Cachaça (). Outro _____

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? (). Sim (). Não

Tipo: _____

Quantidade: (). menos de 30 min (). 30 min (). 1h (). mais de 1 h

Frequência: (). 1x semana (). 2-3x semana (). 4-6x semana

(). Todo os dias (). Menos de 1x semana

Você **FUMA**? (). Sim (). Não Você já **FUMOU**? (). Sim (). Não

Tipo: (). Cigarro (). Charuto (). Cachimbo (). Outro _____

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: (). Sim (). Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: (). Sim (). Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª estação _____

Nº de filhos (). nulípara N: _____

Abortos (). P (). E N: _____

Amamentou: (). Sim (). Não Tempo total (meses): _____

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? (). Sim (). Não Já utilizou AC? (). Sim (). Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável). do AC: _____

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? (). Sim (). Não Já fez TRH? (). Sim (). Não

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

(). Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações: _____

Histórico Médico

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? (). Sim (). Não

Grau de Parentesco: (). filha (). irmã (). mãe (). avó

(). tia materna 1º grau (). tia paterna 1º grau

(). prima materna 1° grau (). prima paterna 1° grau
 (). Outros _____

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família ou pessoal? ().Sim (). Não
 Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de **TUMOR BENIGNO DE MAMA** pessoal? ().Sim (). Não
 Classificação: _____

HISTÓRICO do câncer de mama (versão PACIENTE):

HISTÓRICO do câncer de mama (PRONTUÁRIO):

CLASSIFICAÇÃO do tumor (biópsia após cirurgia):

(). Carcinoma ductal (). Invasivo
 (). Carcinoma lobular (). "in situ"
 ().Microcalcificações (). Doença de Paget
 (). Outro _____

Resultado imunohistoquímica:

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? ().Sim (). Não
 Qual? (s). _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ().Sim (). Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ().Sim (). Não

OSTEOPOROSE: ().Sim (). Não

DOENÇA REUMÁTICA: ().Sim (). Não

DIABETES: ().Sim (). Não

ASMA: ().Sim (). Não

HIV: ().Sim (). Não (). Nunca fez exame

HEPATITE: ().Sim (). Não (). Nunca fez exame

DENGUE: ().Sim (). Não

TUBERCULOSE: ().Sim (). Não

DISTÚRBO RENAL: ().Sim (). Não

DISTÚRBO PULMONAR: ().Sim (). Não

DISTÚRBO HEPÁTICO: ().Sim (). Não

Casos de **DOENÇA DE ALZHEIMER** na família: ().Sim (). Não

Grau de parentesco: _____

Casos de **DOENÇA DE PARKINSON** na família: ().Sim (). Não

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve **DEPRESSÃO**? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? (). Sim (). Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou: _____
