

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
DO DESENVOLVIMENTO**

MARI DALVA STAFFEN

**IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO
PROMOTORA (5'URR) DO GENE *HLA-G* EM PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA**

**FLORIANÓPOLIS
2017**

Mari Dalva Staffen

**IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO
PROMOTORA (5'URR) DO GENE *HLA-G* EM PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA**

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

Florianópolis
2017

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

Staffen, Mari Dalva
IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO
PROMOTORA (5'URR) DO GENE HLA-G EM PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA / Mari Dalva Staffen ; orientador,
Yara Costa Netto Muniz, 2017.
263 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Florianópolis, 2017.

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.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

Mari Dalva Staffen

**IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO
PROMOTORA (5'URR) DO GENE *HLA-G* EM PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestra”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Florianópolis, 11 de agosto de 2017.

Prof. Geison de Souza Izídio, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Yara Costa Netto Muniz, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Andrea Rita Marrero, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Patricia Dillenburg Pilla, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Geison de Souza Izídio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente as pessoas, que ao longo da minha vida acadêmica me ajudaram, ensinando e apoiando.

O meu agradecimento mais do que especial, a minha querida orientadora Dra. Yara Costa Neto Muniz, por ser tão presente, dedicada, paciente e carinhosa. Pela troca de ideias e valiosos ensinamentos. Obrigada pelo companheirismo, amizade e pelas risadas, bem como pela compreensão e apoio nos momentos de dificuldade. Obrigada por me acolher e ajudar a dar mais este importante passo na minha vida.

A Universidade Federal de Santa Catarina e seus funcionários, pela ajuda e suporte. Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, representado pelo atual coordenador professor Dr. Geison de Souza Izídio e a todos os professores do programa pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

A Dra. Ílida Rainha de Souza coordenadora do LAPOGE, por contribuir para minha formação acadêmica, pelos ensinamentos, conselhos e conversas, muito obrigada!

A todos os colegas e professoras do LAPOGE, por auxiliarem de alguma forma na elaboração desse trabalho. Com todo carinho, à Dra. Andrea Rita Marrero pelo incentivo, amizade, e toda a contribuição. Em especial, à Ma. Leili Daiane Hausmann pela amizade, carinho, parceria, disponibilidade em ajudar em vários momentos e por todo o apoio e força, assim como, na correção desse trabalho. Ainda à Ma. Bibiana Sgorla de Almeida, que desde o início do mestrado contribuiu de muitas formas com este trabalho, pelo conhecimento compartilhado, pelo carinho e amizade. E às Ma. Alice Heidrich Prompt e Ma Emily Bruna Justino pelas trocas de conhecimento, conversas, e companheirismo. Agradeço a todos com os quais convivi neste tempo.

À Dra. Sandra Rachadel Torres, pelo carinho e auxílio na realização desse trabalho.

Aos médicos Bráulio Leal Fernandes, Renato Salerno Wilkens e a Daniella Serafin Couto Vieira pelo auxílio na coleta das amostras, bem como, ao Hospital Universitário da UFSC (HU) e demais funcionários desta instituição.

Às mulheres que aceitaram participar desse estudo, em especial as pacientes com câncer de mama.

Ao LAMEB e seus funcionários, pela presença de equipamentos disponíveis com equipe preparada para o atendimento, que permitiram a finalização do presente trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida, e a agência de fomento FAPESC, pelo financiamento do projeto de pesquisa (FAPESC3649/2013) desenvolvido no LAPOGE.

Aos membros da banca examinadora, que gentilmente aceitaram participar, avaliar e contribuir com este trabalho, muito obrigada às Dra. Andrea Rita Marrero, Dra. Patricia Dillenburg Pilla, Dra. Evelise Maria Nazari e ao Dr. Geison de Souza Izídio.

Aos meus queridos pais, Ewaldo e Cecilia, irmãos Elcio, Valdemar, sobrinhos Albert e Adson, a base familiar foi o que possibilitou a conquista dos meus objetivos e propicia força e coragem para seguir a diante. Auxiliando-me sempre em todos os momentos com muita compreensão, confiança e amor. E à minha irmã, Clisten, pela amizade tão maravilhosa, por ser tão parceira para todos os tipos de empreitada, por buscar comigo soluções para os questionamentos, por estar disponível em escutar minhas reclamações, tomar muito café e ser essa pessoa tão especial. OBRIGADA! AMO TODOS VOCÊS!

Aos amigos próximos e distantes que me acompanharam neste caminho, obrigada por tudo!

“Devemos procurar entender quem realmente somos em vez de ficar repetindo a nós mesmos quem deveríamos ser.”

John Powell

RESUMO

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 1,7 milhões de casos diagnosticados anualmente em todo o mundo. Os fatores genéticos, estilo de vida e moléculas com propriedades imunoregulatórias estão implicados na etiologia da doença. O antígeno leucocitário humano (HLA-G) possui função imunomoduladora negativa e sua expressão tem sido associada ao câncer de mama. Vários sítios polimórficos foram descritos na região promotora 5' *HLA-G* (5'URR), que podem afetar a afinidade dos fatores de transcrição e, portanto, influenciar diretamente a expressão da proteína. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a associação de variações de nucleotídeo único (SNVs) da 5'URR do *HLA-G* com susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama e suas manifestações clínicas. Um total de 103 pacientes com câncer de mama e 103 controles foram genotipados para 21 SNVs 5'URR *HLA-G*. Doze SNVs (nomeados -762C/T CC; -725G/C/T G e CC; -716T/G TT; -689A/G G, GG e GA; -646A/G G, GG e GA; -486A/C A, AA e CA; -483A/G A; -443G/A A e AA; -400G/A A e AA; -399G/A A e AA; -391G/A A e AA; -297G/A A e AA, alelos e genótipos respectivamente), foram associados ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama. A análise de desequilíbrio de ligação revelou que SNVs da 5'URR estão em forte desequilíbrio de ligação. Além disso, encontramos uma associação de risco com o Grau Elston-Ellis nas posições -762C/T, -509C/G e -443G/A e dados clínicos TNM nas posições -399G/A e -391G/A. Em conclusão, nossos resultados indicam associação entre os polimorfismos da 5'URR do gene *HLA-G* e a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama, sugerindo que a regulação da expressão da molécula HLA-G possivelmente está envolvida na patogênese do câncer de mama.

Palavras-chave: Variações de nucleotídeo único. Fatores transcricionais. Molécula imunomoduladora. Carcinoma mamário.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer among women, with approximately 1.7 million cases diagnosed annually worldwide. Genetic factors, lifestyle and immune regulatory molecules implicate in the etiology of the disease. The Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) is a negative immunomodulatory molecule and its expression has been associated with breast cancer. Several polymorphic sites were described in the *HLA-G* 5' upstream regulatory region (5'URR) and can affect transcription factors affinity influencing protein expression. The aim of this study was to evaluate the association of 5'URR *HLA-G* variations (SNVs) and breast cancer susceptibility, development and clinical findings. A total of 103 breast cancer patients and 103 healthy subjects were genotyped for 21 *HLA-G* 5'URR SNVs. Twelve SNVs ($-762C/TC$; $-725G/C/T$ *G* and *CC*; $-716T/G$ *TT*; $-689A/G$ *G*, *GG* and *GA*; $-646A/G$ *G*, *GG* and *GA*; $-486A/C$ *A*, *AA* and *CA*; $-483A/G$ *A*; $-443G/A$ *A* and *AA*; $-400G/A$ *A* and *AA*; $-399G/A$ *A* and *AA*; $-391G/A$ *A* and *AA*; $-297G/A$ *A* and *AA*, alleles and genotypes respectively), were associated with increased risk of developing breast cancer and a strong linkage disequilibrium was observed in this region. Besides that, according with Elston-Ellis scale we found a risk association in $-762C/T$, $-509C/G$ and $-443G/A$ positions and with clinical data TNM for $-399G/A$ and $-391G/A$ positions. In conclusion, our findings indicate association between some 5'URR *HLA-G* polymorphisms and the susceptibility to breast cancer, suggesting that these polymorphisms can interfere in HLA-G expression and, consequently, be involved in the pathogenesis of breast cancer.

Keywords: Single nucleotide variations. Transcriptional factors. Immunomodulatory molecule. Breast carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática da localização e composição de uma mama normal com vista frontal (A) e lateral (B). 30
- Figura 2 – Representação esquemática do MHC humano. A localização da região do MHC humano no cromossomo 6 (6p22.1) e a disposição de alguns genes dentro das classes II, III e I. Em destaque na cor amarela a localização do gene HLA-G, onde se localiza a região estudada nesse trabalho..... 36
- Figura 3 - Representação esquemática do gene HLA-G e das sete isoformas proteicas descritas do HLA-G geradas por processamento alternativo, sendo quatro ligadas à membrana plasmática e três solúveis. 40
- Figura 4 – Representação esquemática do gene HLA-G, demonstrando a região codificadora (éxons e íntrons), e as regiões reguladoras do gene, compostas pelas regiões 3' não traduzida (3'UTR, do inglês 3' untranslated region) e com destaque a região promotora 5' (5'URR, do inglês 5' *upstream regulatory region*), com as posições dos elementos regulatórios conhecidos, descritos descritas em Castelli e colaboradores (2014b). 46
- Figura 5 - Cromatografia obtida a partir do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Na qual estão evidenciados os SNP -725 G/C/T, -716 T/G e -689 A/G. No cromatograma em questão têm-se os genótipos heterozigotos -725 GC, -716 TG e -689 AG. Código IUPAC: B = G ou C ou T; K = T ou G; R = A ou G. 61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Lista dos sítios de variação encontrados na região promotora 5' do HLA-G, descrito por Castelli e colaboradores (2017), identificando os alelos referência e alternativo.	44
Quadro 2 - Lista com demais pontos de variação encontrados na região promotora 5' do HLA-G, identificando os alelos referência e alternativo. A referência está informada ao lado dos respectivos sítios.	45
Quadro 3 – Polimorfismos da 5'URR do gene HLA-G analisadas.	60
Quadro 4 – Classificação de grupos por estádios (0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV).	64
Quadro 5 - Classificação das amostras, de acordo com a idade, faixa etária e ancestralidade, de mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres sem a doença (controles).	67
Quadro 6 – Classificação para tumores de mama, de acordo com o local e subtipo.	68
Quadro 7 - Frequências alélicas e genotípicas para os grupos casos e controles e valor de p para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) estimadas para os 21 sítios de variações polimórficas considerados no presente estudo.	72
Quadro 8 - Diferenciação alélica e genotípica baseado nos 21 loci estudados.	83
Quadro 9 - Probabilidade (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os vinte e um sítios polimórficos detectados nos grupos casos e controles ($p \leq 0,05$).	85
Quadro 10 - Cálculos de associação (OR) entre a presença de um alelo e/ou genótipo e o desenvolvimento do câncer de mama para nove dos 21 loci averiguados no presente estudo, com seus respectivos valores de intervalo de confiança (IC 95%) e de p.	87
Quadro 11 - 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 (IC 95%) e de p para OR..... 90

Quadro 12 - 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 IC e p. 94

Quadro 13 - Valores significativos das análises de associação (OR), com seus respectivos valores de CI e p, para a classificação TNM entre os estádios I, II e III em mulheres com câncer de mama para os polimorfismos 5'UUR do gene HLA-G..... 97

Quadro 14 - Frequências do dado clínico Grau de Elston-Ellis analisadas em mulheres com câncer de mama. 98

Quadro 15 – Valores significativos das análises de associação de risco (OR) entre os 3 tipos de Grau de Elston-Ellis (Grau I, Grau II e Grau III), e seus valores de IC e p, em mulheres com câncer de mama. 99

Quadro 16 – Resumo comparativo das análises que apresentaram resultados significativos, associados com risco de desenvolvimento de câncer de mama.....100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
APC	Células apresentadoras de antígenos, do inglês <i>antigen-presenting cells</i>
ATF1	Fator ativador de transcrição 1, do inglês <i>Activating Transcription Fator 1</i>
ATM	Nome dado ao gene, sem tradução para o português, do inglês <i>Ataxia-Telangiectasia Mutated Gene</i>
BRCA1	Nome dado ao gene do Câncer de mama de início precoce 1, do inglês <i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	Nome dado ao gene do Câncer de mama de início precoce 2, do inglês <i>Breast cancer 2, early onset</i>
C	Citosina
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, do inglês <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	Células Dendríticas
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CHEK2	Nome dado ao gene, sem tradução para o português, do inglês <i>Checkpoint Kinase 2</i>
CI	Intervalo de Confiança
CN	Controle Negativo
CRE	Elemento responsivo ao cAMP, do inglês <i>cAMP Response Elements</i>
CREB1	Nome dado ao gene, sem tradução para o português, do inglês <i>cAMP Response Element Binding Protein 1</i>
CTL	linfócitos T citotóxicos, do inglês <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>
Del	Alelo deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos osfatados, do inglês <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EnhA	Acentuador A, do inglês <i>Enhancer A</i>
et al.	“e outros”, do latim <i>et alii</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
F	Nome dado à direção Jusante, do inglês <i>Forward</i>
FASL	Fas Ligante, do inglês <i>Fas Ligand</i>
G	Alelo guanina
g	Gramas
GAS	Nome dado ao elemento de ligação dos fatores de transcrição,

sem tradução para o português, do inglês *Interferon Gamma-activated Site*

gDNA	DNA Genômico
HCL	Ácido clorídrico
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano receptor 2, do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HSE	Elemento de choque térmico, do inglês <i>Heat Shock Element</i>
HSF-1	Fator de transcrição para HSP, do inglês <i>Heat Shock Factor - 1</i>
HSP	Proteínas de choque térmico, do inglês <i>Heat Shock Proteins</i>
HU-UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina
IARC	Agencia Internacional para Pesquisa em Câncer, do inglês <i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon gama
IFN- β	Interferon beta
IL	Interleucina
ILT	Receptor de leucócito semelhante à imunoglobulina, do inglês <i>Immunoglobulin-Like Transcript</i>
IMC	Índice de massa corpórea
IMGT	Nome do projeto internacional, sem tradução para o português, do inglês <i>ImMunoGeneTics project</i>
<i>In</i>	Alelo inserção
<i>In/Del</i>	Inserção e deleção
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRF1	Fator regulatório de interferon 1, do inglês <i>Interferon Regulatory Fator 1</i>
ISRE	Elemento responsável pela estimulação de interferon, do inglês <i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de Potássio
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
LCR	Região controladora de <i>locus</i> , do inglês <i>Locus Control Region</i>
M	Molar
mA	miliamperagem
Mb	Megabase

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	micro RNA
mL	mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κβ	Fator Nuclear Kappa β, do inglês <i>Nuclear Factor Kappa β</i>
ng	Nanogramas
NK	Nome dado a célula, sem tradução para o português, do inglês <i>Natural Killer cells</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
PALB2	Nome dado ao gene, sem tradução para o português, do inglês <i>Partner and Localizer of BRCA2 Gene</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol
PR	Receptor de progesterona, do inglês <i>Progesterone Receptor</i>
PRE	Elemento de resposta à progesterona, do inglês <i>Progesterone Response Element</i>
PTEN	Nome dado ao gene, sem tradução para o português, do inglês <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
R	Nome dado a direção montante, do inglês <i>Reverse</i>
RCF	Força Centrífuga Relativa, do inglês <i>Relative Centrifugal Force</i>
RE-	Receptor de Estrógeno
RFX	Complexo multiproteico regulador do fator X, do inglês <i>Regulatory Factor X</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RPM	Rotações por minuto
RRE	Elemento de resposta Ras, do inglês <i>Ras Response Element</i>
RREB1	Nome dado ao gene, sem tradução para o português, do inglês <i>Ras-responsive element binding 1</i>
sHLA-G	HLA-G solúvel

SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
SNV	Variações de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Variation</i>
SXY	Nome dado ao módulo SXY, do inglês <i>SXY module</i>
T	Alelo timina
TA	Temperatura Ambiente
TBE	Tris/Borato/EDTA
T CD4 ⁺	Linfócitos T Auxiliar
T CD8 ⁺	Linfócitos T Citotóxicos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Sistema de Classificação (T: tumor primário; N: número de linfonodos; M: metástase)
<i>TP53</i>	Gene supressor tumoral p53, do inglês <i>Tumor Protein p53</i>
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
<i>U</i>	Unidade
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URR	Região Promotora, do inglês <i>upstream regulatory region</i>
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
V	Voltagem
W	Unidade de potência (<i>Watt</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
β2m	β2-microglobulina
μL	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 CÂNCER DE MAMA	28
1.1.1 Estrutura da Mama	28
1.1.2 Classificação dos carcinomas de mama	31
1.1.3 Aspectos Epidemiológicos e Etiologia	32
1.1.4 Fatores Genéticos e Resposta Imune	33
1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	35
1.2.1 Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) – Histórico	37
1.2.2 Estrutura do Gene	38
1.2.3 Estrutura da Molécula	39
1.2.4 Funções da Molécula HLA-G	41
1.2.5 Polimorfismos do HLA-G	42
1.2.6 Elementos Regulatórios da Expressão do HLA-G e Polimorfismos da 5'URR	44
1.2.7 HLA-G Associado ao Câncer	48
2 JUSTIFICATIVA.....	51
3 OBJETIVO	53
3.1 GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	55
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	55
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO (GDNA)	55
4.4 GENOTIPAGEM DA REGIÃO 5'UR DO GENE <i>HLA-G</i>	56
4.4.1 Reação em cadeia da polimerase	56
4.4.2 Análise dos Produtos de Amplificação	57
4.4.3 Purificação dos Produtos Amplificados	57
4.4.4 PCR para a Reação de Sequenciamento	57
4.4.5 Precipitação dos Fragmentos Sequenciados	58
4.4.6 Sequenciamento das Amostras	59
4.4.7 Análise das Sequências	59

4.5 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
4.5.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg	61
4.5.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas	61
4.5.3 Diferenciação genética dos grupos amostrais	62
4.5.4 Análises de Associação	62
4.5.5 Desequilíbrio de Ligação	64
5 RESULTADOS	67
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	67
5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	69
5.2.2 Frequências Alélicas e Genotípicas	69
5.2.3 Diferenciação Genética dos grupos amostrais	83
5.2.4 Desequilíbrio de Ligação	84
5.2.5 Análises de Associação	86
6 DISCUSSÃO	101
6.1 CARACTERIZAÇÃO EPIMIOLÓGICA E GENÉTICA	101
6.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO	104
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
REFERÊNCIAS	113
APÊNDICE A - 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 (IC) E DE P	128
APÊNDICE B - 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 (IC) E DE P PARA OR	139
APÊNDICE C - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO (OR), COM SEUS RESPECTIVOS VALORES DE CI E P, ENTRE OS ESTÁDIOS I, II E III EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA PARA OS POLIMORFISMOS 5'UUR DO GENE <i>HLA-G</i>	161
APÊNDICE D - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DE RISCO (OR) ENTRE OS 3 TIPOS DE GRAU DE ELSTON-ELLIS (GRAU I,	

GRAU II E GRAU III), E SEUS VALORES DE IC E P, EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA.	194
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE MAMA	250
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) INDIVÍDUOS-CONTROLES	252
ANEXO C – QUESTIONÁRIO DE INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE MAMA.....	254
ANEXO D – QUESTIONÁRIO INDIVÍDUOS-CONTROLES ...	258
ANEXO E – EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO – MÉTODO SALTING-OUT (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).....	262

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas foi observada uma modificação nos padrões de saúde/doença da população mundial. Houve uma redução das taxas de doenças infectocontagiosas e aumento das doenças crônicas não transmissíveis, especialmente as cardiovasculares e os cânceres. Esse processo é decorrente de uma reorganização global, determinado principalmente, pelo processo de industrialização, com desenvolvimento de medicamentos/tratamentos e avanços na área da saúde, reduzindo a mortalidade (VASCONCELOS; GOMES, 2012).

Os cânceres, doenças crônicas não transmissíveis, são considerados um problema de saúde pública, com altos custos aos serviços de saúde e elevadas taxas de morbidade e mortalidade, tanto em crianças quanto em adultos (TORRE et al., 2016).

Cânceres resultam do acúmulo de alterações genéticas, hereditárias ou adquiridas, e exposição a fatores de risco ambientais ou fisiológicos, que podem interagir de várias formas, que levam ao acúmulo progressivo de mutações celulares (ALBERTS; et al., 2015; INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2012; JACKSON; BARTEK, 2009). A classificação dos cânceres é realizada de acordo com os tecidos e tipos celulares dos quais eles derivam, formando um conjunto de doenças que apresentam essa etiologia multifatorial (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; INCA, 2015).

Esse acúmulo de mutações pode aumentar a capacidade de proliferação descontrolada, originando tumores que não obedecem à organização tecidual, dando origem ao processo cancerígeno. Essas células podem adquirir a capacidade de invadir e colonizar regiões designadas a outros tecidos (células invasivas ou malignas). Quando essas células passam a invadir tecidos que não adjacentes ao tecido de origem do tumor, temos a presença da metástase. (ABBAS et al., 2015; ALBERTS et al., 2015; SGAMBATO; CITTADINI, 2010).

Ressalta-se que a letalidade dos cânceres é, em parte, determinada pela progressiva resistência à morte celular, atividade proliferativa desregulada e capacidade de metastatizar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; MCLORNAN; LIST; MUFTI, 2009). Assim a capacidade distintiva que possibilita o crescimento tumoral e a disseminação metastática são os mecanismos de escape de supressores de crescimento e manutenção de sinais proliferativos. Bem como, a ativação de mecanismos de invasão e metástase, indução da

angiogênese, imortalidade replicativa e resistência à morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Considera-se que a maioria dos casos de câncer de mama seja devido à interação de vários genes, exposição a fatores hormonais e ambientais (INCA, 2015). Entre estes genes está o *HLA-G*, que atua na modulação da resposta imune. O aumento do nível de expressão da molécula HLA-G tem sido associado com diversas condições clínicas, entre elas o desenvolvimento do câncer de mama (CAROSELLA et al., 2011; DIAS et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), são estimados mais de 20 milhões de novos casos até 2025, dentre estes, 80% dos casos de câncer serão registrados na população dos países em desenvolvimento (INCA, 2015; STEWART; WILD, 2014).

A estimativa mundial realizada pelo projeto Globocan/Iarc em 2012, apontou 14 milhões de novos casos, e oito milhões de óbitos previstos, sendo que estas estimativas são decorrentes do aumento do tempo de vida, da exposição prolongada a fatores de risco e mudanças no estilo de vida (FERLAY et al., 2015; GHONCHEH; MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2016).

O número de novos casos cresce globalmente, sendo o câncer de mama, alvo do presente estudo, uma das principais causas de morte de mulheres no mundo, com uma incidência que aumenta com a faixa etária. Onde a maior parte dos casos é registrada entre 65 e 70 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Em 2012 foram relatados, aproximadamente, 1,7 milhões de novos casos de câncer de mama feminino no mundo e ocorreram 521.900 mortes (FERLAY et al., 2015). No Brasil, segundo o INCA, em 2017 são esperados 57.960 casos novos de câncer de mama, com risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Excluindo-se tumores de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais frequente em mulheres nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste. Assim, a situação no Brasil assemelha-se ao cenário internacional (INCA, 2015).

1.1 CÂNCER DE MAMA

1.1.1 Estrutura da Mama

O desenvolvimento da glândula mamária inicia no período embrionário com o aumento da ectoderme para formação de uma linha mamária do estrato germinativo, seguido do desenvolvimento do botão

mamário que se aprofunda na derme e a formação de canais (BUTNER et al., 2016).

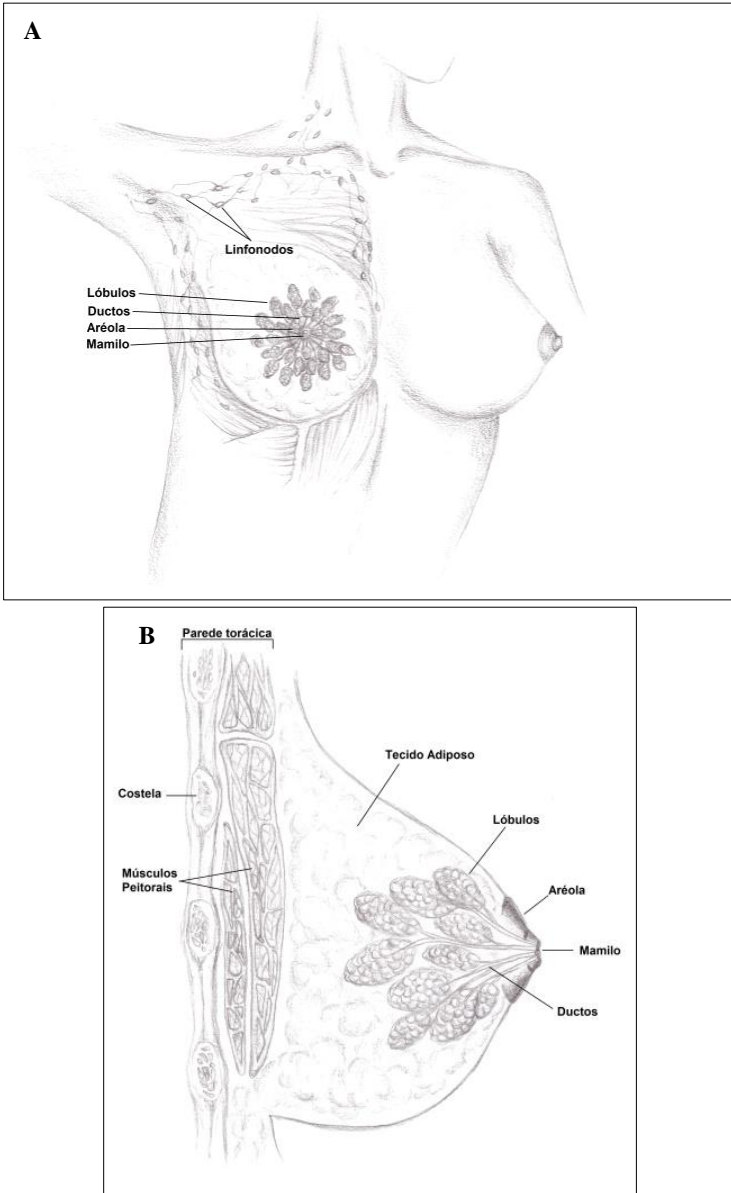
A glândula mamária, do nascimento até a puberdade, sofre pouco desenvolvimento. Apenas após o início da puberdade, sob a influência dos hormônios estrogênio e progesterona e demais fatores a mama segue seu desenvolvimento. Ocorre o crescimento associado com o alongamento e ramificação dos ductos mamários e desenvolve-se o sistema lobuloalveolar. As células epiteliais mamárias completarão a sua diferenciação na primeira gestação, atingindo a completa capacidade funcional. Durante a vida da mulher, a glândula mamária pode sofrer expansão, proliferação e involução (BUTNER et al., 2016; VARNER; NELSON, 2014; INMAN et al., 2015).

A ação dos hormônios sexuais femininos, pela regulação endócrina é fundamental para o processo de desenvolvimento da glândula mamária (MANAVATHI; SAMANTHAPUDI; GAJULAPALLI, 2014). Sua morfogênese atinge o desenvolvimento completo após a gestação, portanto, mulheres nulíparas, que possuem um maior número de estruturas indiferenciadas são mais suscetíveis à transformação maligna (MEIER-ABT; BENTIRES-ALJ, 2014). Somado a isso, a lactação é considerada fator de proteção contra o câncer de mama (ANOTHASINTAWEE et al., 2013; INCA, 2015).

As mamas são órgãos pares, localizadas na parte anterior do tórax, sobre os músculos peitorais, constituídas de gordura, tecido conjuntivo, glândulas e ductos (Figura 1). O corpo da glândula mamária é constituído pelos sistemas lobulares e ductais. Cada glândula mamária é formada de 15 a 25 lóbulos de glândulas túbulo-alveolares compostas, responsáveis pela secreção do leite materno. Cada lóbulo envolto por tecido conjuntivo e adiposo é uma glândula individualizada, ligada ao ducto excretor, chamado ducto galactóforo. Esses ductos galactóforos possuem várias ramificações, são constituídos de canais responsáveis pelo transporte do leite dos lóbulos até o mamilo, que apresenta uma abertura para a liberação do leite. Na região central da mama encontra-se a aréola, formada por uma diferenciação da pele, de onde emerge o mamilo (CANADIAN CANCER SOCIETY, 2017; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

Há uma variedade de tecidos envolvidos na gênese das lesões, que apresentam regulação de expressão diferenciada. E também, pela composição genética de cada indivíduo, gerando susceptibilidades a fatores de risco diferentes (SANTIAGO; GUEDES; PRANCHEVICIUS, 2014).

Figura 1 – Representação esquemática da localização e composição de uma mama normal com vista frontal (A) e lateral (B).



Fonte: Desenhos elaborados pela autora, 2017.

1.1.2 Classificação dos carcinomas de mama

O câncer de mama apresenta variações morfológicas. Isso reflete a complexidade da doença e explica os diversos tipos tumorais e, conseqüentemente, respostas terapêuticas distintas. Considerando isso, o câncer de mama mais comum é o carcinoma (alvo no presente estudo) que pode ter origem nos epitélios glandulares e de revestimento papilar (AMBS, 2010; ASSI et al., 2013; BOYD et al., 2010).

O termo carcinoma é usado para definir o câncer que tem origem nas células epiteliais, que cobrem a superfície do corpo e revestem os órgãos internos. A mama é composta por um sistema de glândulas e ductos recobertos por células epiteliais, o que propicia o desenvolvimento do carcinoma (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Considerada uma doença heterogênea com relação à clínica e à morfologia, são diversos os tipos histológicos dos carcinomas da mama. A Organização Mundial da Saúde reconhece mais de 20 subtipos diferentes da doença, sendo o mais comum o carcinoma ductal invasivo (CAMPA et al., 2015; INCA, 2015).

Denomina-se carcinoma *in situ*, quando as células estão localizadas no tecido de origem, e invasivo, quando estas têm potencial de invadir áreas vizinhas, atingir linfonodos e outros órgãos. E o carcinoma pode ser classificado em ductal ou lobular, dependendo do local de origem (INCA, 2014).

O tipo ductal é quando se origina nos ductos mamários, com diferentes subtipos, e representam cerca de 80 a 90% do total dos casos (INCA, 2014). O carcinoma ductal *in situ* é a forma inicial e não invasiva, caracteriza-se pela proliferação epitelial intraductal, podendo ser o precursor direto do carcinoma ductal invasivo (CAMPA et al., 2015).

Lobular quando sua origem é nos lóbulos, e representam cerca de 5 a 10% dos casos (INCA, 2014). Da mesma forma os carcinomas lobulares *in situ* são lesões iniciais ainda não invasivas, mas que comprometem a unidade lobular e podem propagar-se para os ductos (CAMPA et al., 2015).

Os carcinomas invasivos de mama apresentam a potencialidade de transpassar a membrana basal da unidade ductotubular terminal, invadir o estroma e gerar metástase. O carcinoma ductal invasivo apresenta vários subtipos histopatológicos, entre estes, alguns associados a um melhor prognóstico, como medulares, tubulares e mucinosos, enquanto que os linfomas, sarcomas e melanomas, de

prognóstico ruim, são mais raros. Assim como, a Doença de Paget, tipo tumoral que acomete a aréola e/ou mamilo, cuja maioria dos casos apresenta associação com carcinoma *in situ* ou carcinoma invasivo, representam cerca de 1% dos carcinomas mamários (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; INCA, 2014, 2015).

1.1.3 Aspectos Epidemiológicos e Etiologia

Como dito anteriormente, o câncer com maior incidência e mortalidade mundial entre as mulheres é o de mama. Apesar de, na maioria dos casos apresentarem bom prognóstico, é considerada a quinta principal causa de morte, levando em conta as mortes por todos os tipos de câncer. Entre os cânceres femininos, é considerada a causa mais frequente de mortes em países em desenvolvimento e a segunda nos desenvolvidos (FERLAY et al., 2015).

As mulheres representam 49,6% da população mundial (UNITED NATIONS POPULATION DIVISION, 2017), onde uma grande proporção apresenta mais de 60 anos. Considerando que o câncer de mama é mais frequente quanto maior é a expectativa de vida, esta doença torna-se um importante caso de saúde mundial.

Isso porque, o aumento da incidência do câncer de mama junto com o envelhecimento ocorre em decorrência da exposição acumulativa a fatores de risco. Na faixa etária de 30 anos de idade, uma em cada 227 mulheres são suscetíveis ao desenvolvimento, em mulheres com 50 anos o risco eleva-se para 1 caso em 42 mulheres, com idade igual ou superior a 70 anos apresentam risco de 1 caso para cada 26 mulheres (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017).

Contudo, em mulheres jovens o câncer de mama apresenta características clínicas e epidemiológicas distintas. Frequentemente são mais agressivos, superexpressam o gene do fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 (HER2) e apresentam alta taxa de mutação nos genes de câncer de mama de início precoce 1 e 2 (BRCA1 e BRCA2, respectivamente) (INCA, 2015).

A origem da maior parte dos casos de câncer de mama não é conhecida. Diferentes pesquisas indicam que a carcinogênese pode ser desencadeada por alterações genéticas e epigenéticas, tanto hereditárias quanto adquiridas, devido a presença de fatores ambientais e hormonais, que adicionam maior suscetibilidade às alterações genéticas (INCA, 2015; WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2007). Definindo assim como uma doença de etiologia multifatorial (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; ANJOS; ALAYALA; HÖFELMANN, 2012).

Os principais fatores de risco conhecidos para o câncer de mama são o sexo feminino e a idade (INCA, 2015; JEMAL et al., 2011). Outros fatores importantes estão relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, menopausa tardia, gravidez com idade avançada, nuliparidade), ao histórico familiar de câncer de mama em idade precoce e à alta densidade do tecido mamário. Além desses, dietas ricas em gordura, consumo de álcool em excesso, sobrepeso, sedentarismo e exposição à radiação ionizante, também são considerados potenciais agentes para o desenvolvimento da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; ANJOS; ALAYALA; HÖFELMANN, 2012; GRADISHAR WJ; et al., 2016; INCA, 2015; HARVIE, 2015).

A glândula mamária é altamente regulada por mecanismos endócrinos. O uso de estrógeno e progesterona exógenos para reposição hormonal ou ação anticoncepcional, está associado ao maior risco em desenvolver câncer de mama (HUZELL et al., 2015; INCA, 2015). Esses hormônios podem atuar como iniciadores ou promotores da carcinogênese, porque além de estimular a proliferação celular e diminuir a apoptose, junto à progesterona, o estrógeno libera metabólitos carcinogênicos, que causam danos no DNA (BROWN; HANKINSON, 2014; LANFRANCHI, 2014).

1.1.4 Fatores Genéticos e Resposta Imune

O câncer de mama, enfermidade crônica, caracterizada pelo crescimento desordenado das células malignas com potencial invasivo e metastático. Esse potencial é provocado, principalmente, pelo acúmulo progressivo de alterações genéticas, tais como mutações de ponto, ampliações cromossômicas, deleções, rearranjos, translocações e duplicações (WOOD et al., 2007).

Considerando a herança, os cânceres de mama podem ser classificados como, esporádico ou familiar. As formas familiares da doença, também chamadas hereditárias, representam de 5 a 10% dos casos de câncer de mama. Dentre os genes conhecidos, destacam-se o *BRCA1* e o *BRCA2* (BELL, 2010).

Os cânceres de mama denominados esporádicos representam de 90 a 95% dos casos, não sendo bem conhecido o papel dos genes envolvidos. Esses cânceres são decorrentes de mutações somáticas, ou de genes herdados de baixa penetrância, que culminam com a transformação de uma célula normal em tumoral, principalmente quando

somados a ação de fatores ambientais de predisposição (carcinógenos) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; PETRUCCELLI, 2016).

Os fatores genéticos envolvidos nos cânceres esporádicos são complexos, com inúmeras mutações devido à replicação errônea do DNA, ou como resultado de exposição à carcinógenos endógenos e exógenos. Esses estão envolvidos em diversas vias metabólicas, contribuindo para o entendimento da grande variabilidade da doença em termos de comportamento biológico e responsivo aos tratamentos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; DUFLOTH et al., 2005; INCA, 2015).

Alguns desses genes apresentam função crítica na regulação da resposta imune e, assim, quando alterados aumentam o risco do desenvolvimento da neoplasia, incluindo tumores mamários (ECONOMOPOULOU; DIMITRIADIS; PSYRRI, 2015). A compreensão das vias de sinalização molecular envolvidas na inflamação e sua correlação com o câncer aumentam de maneira significativa. As células do sistema imune inato e adaptativo desempenham um importante papel na prevenção ou suscetibilidade para o início, progressão e propagação tumoral (BLANKENSTEIN et al., 2012; DE VISSER; COUSSENS, 2005).

A capacidade de células malignas proliferarem e invadirem tecidos do hospedeiro, bem como a sobrevivência dos tumores, é dependente de mecanismos que inibem a resposta imune, desregulam o ciclo celular e induzem a tolerância. Tanto em nível das células tumorais, estromais e sua interação entre o microambiente e o tumor (ABBAS et al., 2015; BORRELLO; DEGL'INNOCENTI; PIEROTTI, 2008).

Desta forma, a progressão do câncer reflete interações moleculares e celulares entre o tumor e o sistema imunológico do indivíduo (LU; FINN, 2008). Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) exercem papel fundamental na regulação da resposta imune, atuando também nos mecanismos de defesa contra a carcinogênese. Assim, polimorfismos podem alterar os produtos desses genes e predispor a doenças imune-relacionadas, incluindo a suscetibilidade ao câncer, devido a diferenças funcionais das moléculas expressas (DONADI et al., 2011; ABBAS et al., 2015).

1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

As células e moléculas responsáveis pela nossa defesa constituem o sistema imune, que têm função crítica de distinguir antígenos estranhos (não-próprios) de antígenos autólogos (próprios) dos tecidos corporais. A defesa é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas mais tardias da imunidade adquirida, papel fundamental do MHC (ABBAS et al., 2015; BACH, 1976; MACKAY et al., 1977; GILL et al., 1978).

O sistema gênico designado MHC foi descoberto em estudos sobre transplantes de tecidos, onde George Snell e colaboradores, na década de 1940, analisavam a base genética da rejeição de enxertos em camundongos endogâmicos. Mais tarde, foram descritos em outras espécies de mamíferos, complexos gênicos homólogos envolvidos na resposta imune (ABBAS et al., 2015; BACH, 1976; MACKAY et al., 1977; GILL et al., 1978).

Na busca por moléculas de superfície celular em um indivíduo, não reconhecida por outro indivíduo, em 1958, foram publicados três artigos por Jean Dausset, Jon van Rood e Rose Payne e colaboradores, que trabalhavam na identificação de anticorpos no soro de indivíduos que haviam recebido múltiplas transfusões de sangue e pacientes submetidos a transplantes renais, a partir destas pesquisas, descreveram o MHC humano (ABBAS et al., 2015; MEHRA, 2010; THORSBY, 2009).

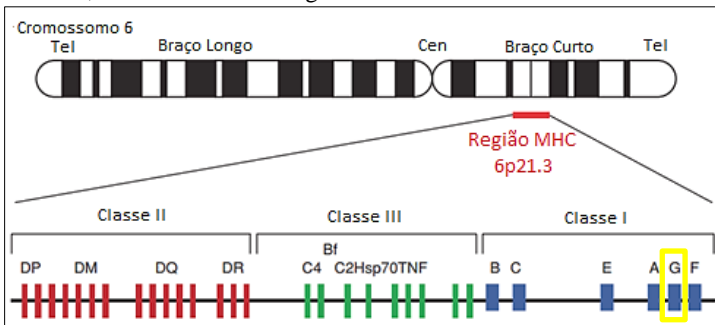
Durante duas décadas, o único papel do MHC era relacionado à rejeição de enxertos, entretanto, nas décadas de 60 e 70 foi descoberto que os genes do complexo são relevantes para todas as respostas imunes a antígenos proteicos. Em um estudo clássico, publicado em 1975, Rolf Zinkernagel e Peter Doherty provaram que o MHC está envolvido no reconhecimento de antígenos pelas células T (DOHERTY; ZINKERNAGEL, 1975).

A primeira sequência completa do MHC em humanos foi publicada em 1999 (THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999). E, assim, foi definida como a região com maior densidade e variabilidade gênica, pois alguns desses genes exibem muitas variantes alélicas, indicando alto índice de polimorfismos do genoma humano.

O MHC humano localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p22.1), representa cerca de 2,5% do genoma, abrangendo uma região de aproximadamente 4 Megabases (Mb), com cerca de 224 genes. De acordo com a estrutura e função dos produtos moleculares, são agrupados em classe I, II e III (Figura 2) (CASTELLI et al., 2011;

GARCÍA-OBREGÓN et al., 2011; HORTON et al., 2004; KLEIN; SATO, 2000).

Figura 2 – Representação esquemática do MHC humano. A localização da região do MHC humano no cromossomo 6 (6p22.1) e a disposição de alguns genes dentro das classes II, III e I. Em destaque na cor amarela a localização do gene HLA-G, onde se localiza a região estudada nesse trabalho.



Fonte: Adaptado de MEHRA e KAUR, 2003.

As moléculas do MHC de classe I apresentam peptídeos e são reconhecidos pelos linfócitos T $CD8^+$ e as de classe II são reconhecidos pelos linfócitos T $CD4^+$, desempenhando papel na resposta adaptativa, enquanto que a região MHC de classe III codifica moléculas que participam da imunidade inata, genes que codificam citocinas, ou que atuam na ativação do sistema complemento (ABBAS et al., 2015; LEWIN, 2009; PURCELL; ELLIOTT, 2008; ROCHA; NEEFJES, 2008).

Fazendo parte do MHC humano, o Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) produz moléculas que são expressas pelos leucócitos (HVIID et al., 2006). Os genes HLA codificam importantes moléculas que atuam na indução ou regulação da resposta imune (HOWELL; CARTER; CLARK, 2010).

Segundo suas funções biológicas, o HLA classe I é classificado em genes clássicos (Ia) e genes não clássicos (Ib). Sendo que, a maioria destes genes codificam proteínas transmembranas, que se associam a fragmentos peptídicos derivados de antígenos proteicos fagocitados e processados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-presenting Cells*) e apresentados a células do sistema imune, principalmente os linfócitos T (DONADI, 2000; HVIID et al., 2006; SULLIVAN et al., 2006).

Os genes Ia, *HLA-A*, *-B* e *-C*, apresentam expressão tecidual constitutiva, praticamente em todas as células nucleadas, são altamente polimórficos com grande número de variantes alélicas em cada *locus*. Os genes Ib, *HLA-E*, *-F* e *-G*, foram identificados por serem altamente homólogos aos genes HLA clássicos, entretanto, são menos polimórficos que os de classe Ia, e podem possuir expressão tecidual restrita. Além destes, outros genes HLAs que não possuem produto proteico associado, são caracterizados como pseudogenes (INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECT - IMGT/HLA Database, 2017; CASTELLI et al., 2010; RIZZO et al., 2014).

Existem três *loci* de HLA de classe II ditos como clássicos, que estão contidos na região HLA-D que é subdividida nas sub-regiões -DP, -DM, -DQ e -DR, que estão envolvidos na apresentação e processamento de antígenos, expressos na superfície das APCs, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e em alguns outros tipos celulares (PARHAM et al., 2012; IMGT, 2017; ABBAS et al., 2015).

Segundo Donadi e colaboradores (2011), as moléculas HLA de classe I não-clássicas têm seu papel associado com modulação da resposta imune e não com a apresentação de antígenos. Dentre essas moléculas, HLA-G é a mais estudada (DONADI et al., 2011) e também o gene alvo desse estudo.

1.2.1 Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) – Histórico

Geraghty e colaboradores, em 1987 descreveram e clonaram o gene codificador de uma molécula incomum de HLA de classe I, a proteína foi inicialmente detectada na linhagem celular de coriocarcinomas, assim como em trofoblastos de placentas, e parecia não ser polimórfica (MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009; VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000). Somente três anos após, em 1990, a molécula HLA-G foi descrita como uma nova molécula HLA de classe I (CAROSELLA et al., 2008; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

Inicialmente descrita na interface materno-fetal, no citotrofoblasto, a molécula contribui para o processo de tolerância imunológica do feto pela mãe, desempenhando papel crucial na implantação e manutenção da gravidez (CASTELLI et al., 2017; HUNT et al., 2006; KLEIN; SATO, 2000; KOVATS et al., 1990; ROUAS-FREISS et al., 1997).

Atualmente, sabe-se que a expressão fisiológica do *HLA-G* é detectada em tecidos imunoprivilegiados de adultos. Entretanto, a

expressão não fisiológica tem sido observada e estudada em situações patológicas em que é necessária a modulação do sistema imune como, doenças inflamatórias, autoimunes, virais, cânceres e transplantes (CAROSELLA et al., 2008; CASTELLI et al., 2011, 2017; CURIGLIANO et al., 2013; DONADI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012; MISRA et al., 2013; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009; NILSSON et al., 2016).

1.2.2 Estrutura do Gene

O gene *HLA-G*, como dito anteriormente, está localizado na região 6p22.1, constituído de 4.164 pares de base (pb) (EMBL-EBI, 2017), dividido em regiões codificadoras e reguladoras (CASTELLI et al., 2011; DONADI et al., 2011; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

As regiões reguladoras do gene, são compostas pelas regiões promotora 5' (5'URR, do inglês *5' upstream regulatory region*) e a região 3' não traduzida (3'UTR, do inglês *3' untranslated region*), que apresentam importantes polimorfismos com capacidade de alterar a afinidade do gene por fatores de transcrição e microRNAs (miRNA), respectivamente (CASTELLI et al., 2011; DONADI et al., 2011).

Inicialmente acreditava-se que a região codificadora do *HLA-G* compartilhava similaridades estruturais com outros genes HLA de classe I clássicos: HLA-A, HLA-B e HLA-C, e a definição dos oito éxons e sete íntrons foi baseada nas semelhanças com as sequências consenso dos genes clássicos. Porém mais tarde foi identificada a maior semelhança do *HLA-G* com o *HLA-E* (DONADI et al., 2011; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009; FAVIER et al., 2007).

Castelli e colaboradores (2014a) assumem como mais completa a nomenclatura dos éxons e íntrons definida pelo NCBI/Ensembl, no qual o éxon 1 é a parte inicial e o éxon 2 codifica a porção final da região 5' não traduzida (5'UTR, do inglês *5' untranslated region*), que se mantém no mRNA maduro, o éxon 2 também contém o principal ponto de início da tradução (CASTELLI et al., 2014a).

Os domínios α -1, α -2 e α -3 são respectivamente codificados pelos éxons 3, 4 e 5. O éxon 6 codifica o domínio transmembranar e o éxon 7 a cauda citoplasmática curta, devido a um códon de parada prematura, o segmento após este códon de parada, porção restante do éxon 7 e ao éxon 8 formam a 3' UTR (CASTELLI et al., 2014a).

A presença de fatores de transcrição específicos ou mecanismos que promovem a indução da expressão do *HLA-G* possibilitam que o

gene presente mais de um ponto de início da transcrição. A falta de consenso quanto ao local exato do início da transcrição também é constatada com relação à tradução, no qual existem três possíveis pontos, um no início da sequência descrita como codificadora e dois na 5°UTR (CASTELLI et al., 2014a).

1.2.3 Estrutura da Molécula

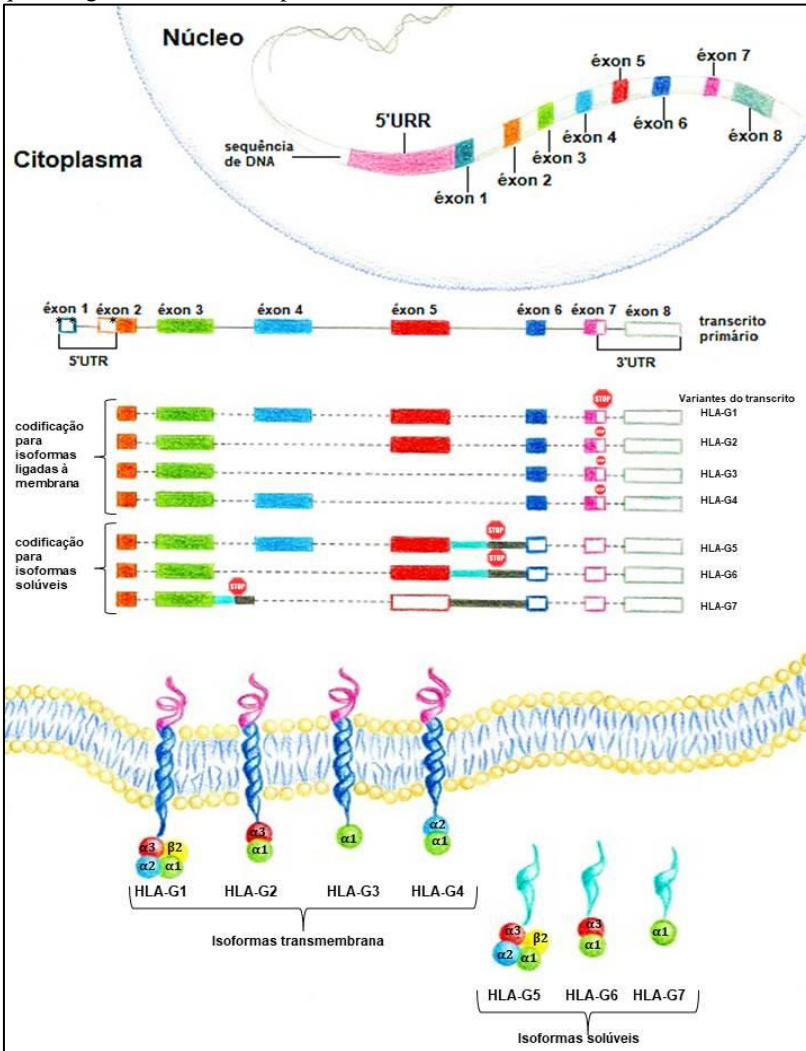
O gene *HLA-G* codifica moléculas ligadas ou não à membrana, com domínios extracelulares, que podem associar-se à cadeia leve β_2 -microglobulina (β_2m), codificada por um gene localizado no cromossomo 15 (CASTELLI et al., 2014a; DONADI et al., 2011).

São identificadas sete isoformas proteicas geradas por processamento (*splicing*) alternativo do transcrito primário. Quatro isoformas são ligadas à membrana, possuem domínio transmembranar e cauda citoplasmática curta (HLA-G1, G2, G3 e G4). As demais isoformas, devido a falta do domínio transmembranar são solúveis (sHLA-G) (HLA-G5, G6 e G7) (CAROSELLA et al., 2008; DONADI et al., 2011). Detectável no soro/plasma, a molécula sHLA-G é expressa principalmente por monócitos (Figura 3) (REBMANN et al., 2016).

As isoformas HLA-G1 e HLA-G5 são estruturalmente análogas às moléculas HLA classe I, compostas de uma cadeia pesada com três domínios globulares (α -1, α -2 e α -3) associadas a uma β_2m . A isoforma HLA-G2 não apresenta o domínio α -2, assim como a isoforma solúvel HLA-G6. O HLA-G3 não possui os domínios α -2 e α -3, enquanto que na isoforma HLA-G4 o domínio α -3 está ausente. A isoforma HLA-G7 apresenta o domínio α -1 e a cauda citoplasmática. A solubilidade das isoformas HLA-G5, G6 e G7 é devido à ausência do domínio transmembranar e a presença de uma cauda com 21 aminoácidos (DONADI et al., 2011; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

Segundo Campbell e colaboradores (2012), mecanismos de regulação direcionam a produção das diferentes isoformas de HLA-G, assim como o tipo celular envolvido e a condição fisiológica que também atuam na expressão ou não do gene (CAMPBELL; ANTONY; POWIS, 2012). Fatores ambientais endógenos como citocinas, hormônios, privação de nutrientes e estresse, e fatores exógenos como fármacos, 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).

Figura 3 - Representação esquemática do gene HLA-G e das sete isoformas proteicas descritas do HLA-G geradas por processamento alternativo, sendo quatro ligadas à membrana plasmática e três solúveis.



5'URR: região promotora 5' (do inglês *5' upstream regulatory region*); 5'UTR: região 5' não traduzida (do inglês *5' untranslated region*); 3'UTR: região 3' não traduzida (do inglês *3' untranslated region*); *: ATG; STOP: Códon de parada; retângulos contornados: regiões não traduzidas; ---: íntrons removidos. Fonte: Elaborado pela autora 2017, baseado em Castelli et al., 2014a.

1.2.4 Funções da Molécula HLA-G

A molécula HLA-G tem como principal função propriedades imunomodulatórias (CASTELLI et al., 2017). Em condições saudáveis, sua expressão é restrita à placenta e células do trofoblasto, para a manutenção da gravidez e a tolerância materno-fetal, bem como limitada a poucos tecidos em condições fisiológicas como na córnea, timo, pâncreas, precursores endoteliais e eritroides, e matriz da unha (CAROSELLA et al., 2008; DISCORDE et al., 2003; HUNT et al., 2006; LEFEBVRE et al., 2000; MENIER et al., 2004; NGUYEN-LEFEBVRE et al., 2016).

A molécula apresenta uma fenda de ligação a peptídeos pouco polimórfica e um conjunto de peptídeos limitados. Essas características fazem com que ela não seja apresentadora de peptídeos antigênicos aos linfócitos T, como as moléculas HLA clássicas (CASTELLI et al., 2014b; DONADI et al., 2011). Sendo, portanto, reconhecida como mediadora na tolerância imunológica, pois exerce suas funções de maneira direta, através da inibição/bloqueio das células efetoras ou indireta, pela geração de células reguladoras (GONZÁLEZ et al., 2012).

Entre as funções diretas, a molécula HLA-G inibe a função e maturação de APCs, a atividade citotóxica e de proliferação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL CD8⁺) e células NK (do inglês *Natural Killer*), e também as respostas aloproliferativas de linfócitos T CD4⁺, protegendo a célula-alvo (CURIGLIANO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2012; ROUAS-FREISS et al., 1997).

A interação de sHLA-G com a molécula CD8⁺ isoforma faz com que células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs do inglês *Cytotoxic T Lymphocytes*) que expressam CD8⁺ pela indução da expressão de ligante Fas (FasL), sofram apoptose, E, especificamente sHLA-G5 inibe a proliferação, diferenciação e produção de imunoglobulinas por linfócitos B (CONTINI et al., 2003; NAJI et al., 2014; PUPPO et al., 2002).

Com funções tolerogênicas indiretas a molécula HLA-G é capaz de inibir outras células T, pela geração de células T reguladoras (CURIGLIANO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2012). Participando da supressão da resposta imune, células dendríticas (CD) que expressam interleucina 10 (IL-10, do inglês *Human Interleukin-10*) e HLA-G, podem induzir a inativação funcional e a capacidade responsiva dos linfócitos T, e induzir a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naïve* em células T reguladoras (GREGORI et al., 2010; LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005). A indução de trogocitose possibilita células T e NK ativadas agirem como células supressoras, após

receberem membranas celulares contendo HLA-G durante o contato intercelular (LEMAOULT et al., 2007).

A expressão da molécula HLA-G em níveis não-fisiológicos, apresenta características imunotolerantes associadas com doenças inflamatórias, autoimunes e transplantes (tolerância imunológica) e doenças infecciosas e tumorais (escape imunológico) (AMODIO; SALES DE ALBUQUERQUE; GREGORI, 2014).

Outra característica da molécula HLA-G na execução de suas funções, é que esta se liga a receptores leucocitários inibidores, como os receptores de leucócito semelhante à imunoglobulina tipo (ILT, do inglês *Immunoglobulin-Like Transcript 2*) e ILT-4, e também, com o receptor tipo imunoglobulina de células NK 2DL4 (KIR2DL4, do inglês *Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors*), que são diferencialmente expressos em células imunes. Células NK, linfócitos, macrófagos e CD expressam o receptor ILT-2, enquanto o receptor ILT-4 é restrito a células mielóides (monócitos, macrófagos e CD) (ALEGRE et al., 2014).

Segundo Donadi e colaboradores (2011), os receptores ILT-2 e ILT-4 podem interagir com outras moléculas HLA clássicas, porém ambos apresentam afinidade superior com a molécula HLA-G. Em contraste, o receptor KIR2DL4 expresso em todos os tipos de células NK e alguns linfócitos T CD8+, parece ter a molécula HLA-G como o único ligante (DONADI et al., 2011; FAURE; LONG, 2002; GONZÁLEZ et al., 2012).

1.2.5 Polimorfismos do *HLA-G*

O *HLA-G* possui 56 alelos descritos na região transcrita, agrupados em 18 variantes proteicas encontradas em todas as isoformas e duas proteínas truncadas (alelos nulos) (IMGT/, 2017), entretanto, apenas 10 alelos possuem frequência mundial maior que 1%, por isso, é considerado pouco polimórfico quando comparado a regiões transcrita de outros gene *HLA* (CASTELLI et al., 2014a). Porém, análises baseadas nas sequências nucleotídicas do projeto *1000Genomes*, demonstram a presença de 81 variações de nucleotídeos únicos (SNVs, do inglês *Single Nucleotide Variations*) nas região transcrita, em introns ou, quando em região codificadora, apresentam modificações sinônimas (CASTELLI et al., 2014a).

As sequências exônicas do gene *HLA-G* codificam resíduos importantes para a produção de isoformas, dimerização da molécula, interação com seus receptores e exercício de suas funções efetoras

(CASTELLI et al., 2014b). Com isso, polimorfismos presentes na região codificadora podem acarretar mudanças conformacionais na molécula, que impactam diretamente nas funções biológicas e características de modulação da resposta imune (DONADI et al., 2011). Os polimorfismos descritos nessa região se distribuem ao longo dos domínios α -1, α -2 e α -3 (CASTELLI et al., 2014a; DONADI et al., 2011).

Entretanto, ainda não é conhecido o efeito dos polimorfismos do gene *HLA-G* na expressão da molécula. Supõe-se que a região transcrita possa ser regulada por processos pré-transcricionais, quando os polimorfismos estão presentes na região 5'URR, podendo modificar elementos regulatórios e afinidade por fatores de transcrição. Ou pós-transcricionais, quando presentes em regiões regulatórias, 5'UTR e, principalmente, 3'UTR e introns, regulando o processamento alternativo e a tradução. (CASTELLI et al., 2014b).

A 3'UTR do *HLA-G* apresenta uma alta frequência de sítios de variação em um segmento de 754 nucleotídeos, cerca de 17 sítios dos quais, 10 são considerados polimorfismos, um de presença ou ausência de um fragmento de 14 pares de base (14 pb *InDel*) e nove polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single-Nucleotide Polymorphisms*) (CASTELLI et al., 2014a; LARSEN et al., 2010). Essa região contém vários elementos regulatórios como sinais de poliadenilação (KUERSTEN; GOODWIN, 2003), regiões ricas de elementos AU (ALVAREZ et al., 2009) e sítios polimórficos que influenciam a estabilidade do mRNA e sua capacidade de tradução, incluindo ação de miRNA, que podem se ligar nessa região. (DONADI et al., 2011; KUERSTEN; GOODWIN, 2003).

Os níveis de transcrição do *HLA-G* são regulados principalmente por sítios de variações presentes na 5'URR, que podem interferir na ligação dos fatores de transcrição (CASTELLI et al., 2014a). Esses polimorfismos têm impacto relevante na regulação da expressão do gene, uma vez que muitas destas variações estão dentro, ou próximos de conhecidos ou prováveis elementos reguladores da transcrição (AMODIO; SALES DE ALBUQUERQUE; GREGORI, 2014; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

Segundo Castelli e colaboradores (2017), a região promotora constituída pelo segmento a montante do primeiro ATG traduzido, do nucleotídeo -1406 ao -1. Conforme as análises do projeto *1000Genomes* (CASTELLI et al., 2014a), foram identificados 35 SNVs na região promotora, entre estes, 26 considerados polimorfismos (frequência dos alelos acima de 1%). De acordo com estudo realizado por Castelli e

colaboradores (2017), atualmente são identificados 36 SNVs, organizados em 23 diferentes haplótipos (CASTELLI et al., 2017).

1.2.6 Elementos Regulatórios da Expressão do *HLA-G* e Polimorfismos da 5'URR

A região promotora do *HLA-G* se estende por cerca de 1,5 kilobases (Kb). Ela difere dos promotores clássicos de classe I, principalmente pela falta de elementos responsivos reguladores para IFN- γ (*Interferon Gama*) e NF- $\kappa\beta$ (*Nuclear Factor Kappa β*). Além disso, sua região proximal não medeia a transativação pelos principais mecanismos descritos para os HLA classe I e são, ainda, identificadas a presença de elementos reguladores alternativos (choque térmico, progesterona e elementos responsivos à hipóxia) (CASTELLI et al., 2014b). Ao todo foram descritos 43 sítios de variação, sendo a maioria descrito por Castelli e colaboradores (2017) (Quadro 1).

Quadro 1 – Lista dos sítios de variação encontrados na região promotora 5' do *HLA-G*, descrito por Castelli e colaboradores (2017), identificando os alelos referência e alternativo.

SNPid	Alelo referência	Alelo alternativo	Posição relatada IMGT/HLA	SNPid	Alelo referência	Alelo alternativo	Posição relatada IMGT/HLA
rs527969449	AGT	A	-1406	rs1632944	G	A	-633
rs113076482	T	G	-1377	rs201221694	A	AG	-546
rs1736936	G	A	-1305	rs368205133	GA	G	-541
rs1736935	A	G	-1179	.	A	G,*	-540
rs3823321	G	A	-1155	rs17875393	C	G	-509
rs1736934	A	T	-1140	rs1736933	A	C	-486
rs17875389	A	G	-1138	rs149890776	A	G	-483
rs3115630	T	C	-1121	rs1736932	C	G	-477
rs146374870	G	A	-1098	rs17875394	G	A	-443
rs1632947	G	A	-964	rs17875395	G	A	-400
rs370338057	C	A	-922	.	G	A	-399
rs182801644	C	T	-810	rs17875396	G	A	-391
rs1632946	C	T	-762	rs1632943	C	A	-369
rs1233334	G	C,T	-725	rs191630481	G	A	-355
rs2249863	T	G	-716	rs781618441	G	A	-297
rs2735022	A	G	-689	rs551170211	TC	T	-256
rs35674592	G	T	-666	rs1233333	G	A	-201
rs17875391	A	G	-646	rs17875397	C	T	-56

Fonte: Material suplementar Castelli et al., 2017.

Além dos sítios acima citados, foram identificados outros pontos de variação (Quadro 2), cujas referências foram anotadas ao lado.

Quadro 2 - Lista com demais pontos de variação encontrados na região promotora 5' do HLA-G, identificando os alelos referência e alternativo. A referência está informada ao lado dos respectivos sítios.

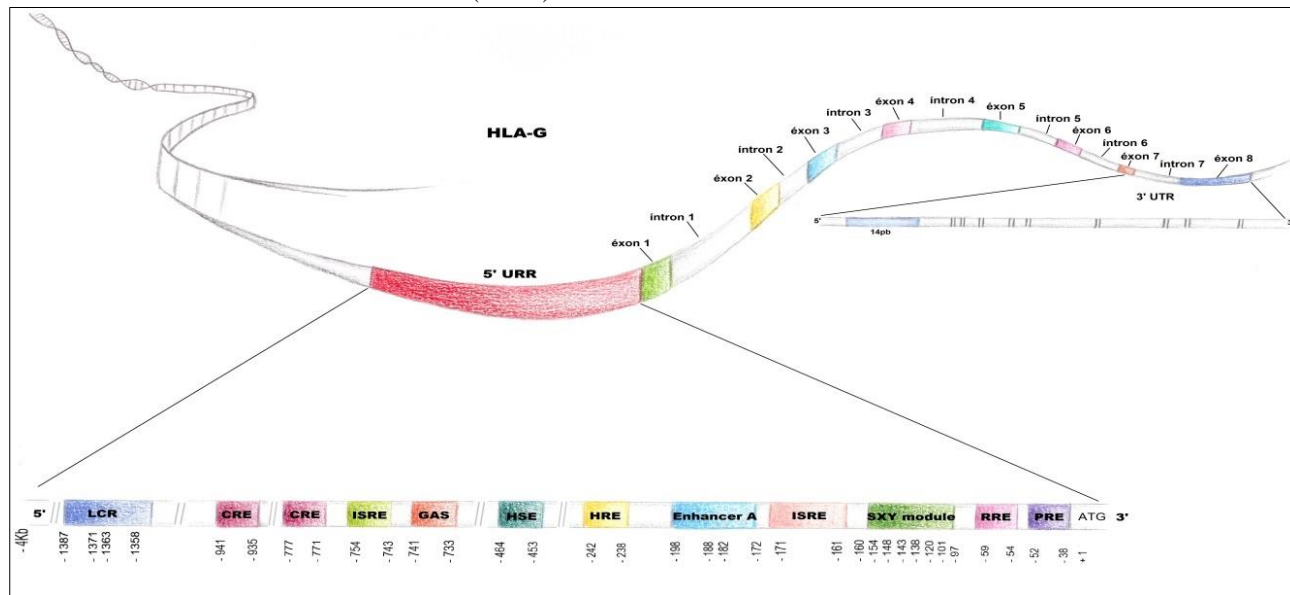
SNPid	Posição relatada IMGT/HLA	Alelo referência	Alelo alternativo	Referência
.	-1310	C	T	1000 Genomes Project
.	-1306	G	A	Tan et al., 2005
.	-990	G	A	Tan et al., 2005
rs112940953	-539	A	G	Castelli et al., 2014a
rs138987412	-521	C	A	Castelli et al., 2014a
.	-284	G	A	Castelli et al., 2014a
.	-150	C	T	Castelli et al., 2014a

Fonte: Elaborado pela autora 2017, baseado em (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al., 2015; CASTELLI et al., 2014a; TAN; SHON; OBER, 2005).

Desta forma, esses SNVs encontrados nessa região podem afetar a ligação de fatores regulatórios da transcrição e, conseqüentemente, causar mudanças na expressão do HLA-G (HVIID et al., 2006; TAN; SHON; OBER, 2005).

A região promotora do *HLA-G* está a montante do códon de início da tradução (ATG), no qual a adenina é designada como nucleotídeo +1, com vários módulos regulatórios descritos. O acentuador A (EnhA, do inglês *Enhancer A*) localizado próximo ao nucleotídeo -201, relatado como ligante do homodímero p50/p50 (entre os nucleotídeos -187/-171), contém as sequências modificadas $\kappa\beta 1$ e $\kappa\beta 2$, que afetam a ligação de afinidade do NF- $\kappa\beta$ (Figura 4) (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015; GOBIN et al., 1998; SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013).

Figura 4 – Representação esquemática do gene HLA-G, demonstrando a região codificadora (éxons e íntrons), e as regiões reguladoras do gene, compostas pelas regiões 3' não traduzida (3'UTR, do inglês 3' untranslated region) e com destaque a região promotora 5' (5'URR, do inglês 5' upstream regulatory region), com as posições dos elementos regulatórios conhecidos, descritos descritas em Castelli e colaboradores (2014b).



Fonte: Elaborado pela autora, 2017, baseado em Castelli et al., 2014a.

Adjacente ao EnhA está o *Interferon-Stimulated Response Element* (ISRE), parcialmente deletado no *HLA-G* e o módulo SXY. A ausência do ISRE na região promotora do *HLA-G* pode torná-lo não responsivo ao INF- γ (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015; GOBIN et al., 1998, 1999; GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000; ROUSSEAU et al., 2004; SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013). O módulo SXY é alvo para o complexo multiproteico regulador do fator X (RFX, do inglês *Regulatory Fator X*) (no nucleotídeo -124).

Estes elementos de regulação têm adquirido mutações ou deleções que tornam a região proximal da 5'URR do gene *HLA-G*, não responsiva aos indutores clássicos da transcrição do MHC classe I (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015).

Podem também estar implicados na regulação da expressão do *HLA-G*, o fator repressor RREB1 (*Ras-responsive element binding 1*) que apresenta três sítios de ligação, conhecidos como elemento de resposta Ras (RRE, do inglês *Ras Response Element*) localizados no promotor proximal entre as posições -59 e -54, entre a -148 e -143 e -139 e -134. Outro sítio alvo relatado localizado na região controladora de locus (LCR, do inglês *Locus Control Region*) entre as posições -1363 e -1358. Os mecanismos subjacentes à repressão do RREB1 estão associados ao recrutamento de proteínas co-repressoras que geram um aumento da condensação da cromatina dificultando a acessibilidade do fator de transcrição (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015).

A progesterona, que é um hormônio esteroide imunomodulatório também pode induzir a expressão do HLA-G. Os mecanismos de indução são mediados pela ativação do receptor de progesterona (PR, do inglês *Progesterone Receptor*) e após a ligação do elemento de resposta à progesterona (PRE, do inglês *Progesterone Response Element*), localizado entre as posições -52 e -38, sobrepostos ao TATA box (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015).

Detectado no gene *HLA-G* e não em outros genes HLA de classe I, no promotor distal, o próximo módulo na posição -480, é o elemento de choque térmico (HSE, do inglês *Heat Shock Element*), responsivo as proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *Heat Shock Proteins*), principalmente ao fator de choque térmico 1 (HSF-1, do inglês *Heat Shock Factor -1*) (nucleotídeo -481). HSPs são proteínas reguladoras que modulam a resposta imune, induzidas por estresse (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015; IBRAHIM et al., 2000; SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013).

Outra sequência regulatória, reportada como não responsiva no *HLA-G*, localizada entre as posições -741 e -733, é o sítio ativado por

Interferon- γ (GAS, do inglês *Interferon Gamma-activated Site*) (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015; SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013); SHU et al., 1999).

Na posição -746, próximo ao GAS, há outro *Interferon-Stimulated Response Element* (ISRE), responsivo ao Interferon- γ , que modula a expressão do *HLA-G* pela ligação do fator regulador de interferon 1 (IRF1, do inglês *Interferon Regulatory Fator 1*) (nucleotídeos -743) (GINEAU et al., 2015; LEFEBVRE et al., 2001; SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013).

O fator ativador de transcrição 1 (ATF1, do inglês *Activating Transcription Fator 1*) (nos nucleotídeos -771 e -1371) e/ou elemento de resposta ao cAMP ligado a proteína 1 (CREB1, do inglês *cAMP Response Element Binding Protein 1*) (nos nucleotídeos -771, -935 e -1371), podem ligar-se a três elementos de resposta cAMP (CRE, do inglês *cAMP Response Elements*) (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015).

A região controladora de *locus* (LCR, do inglês *Locus Control Region*) do *HLA-G*, localizada a 1,2Kb a montante do primeiro ATG traduzido, é uma região de ativação *cis* de um longo segmento de DNA, nela são encontrados CRE e RRE. A região LCR desempenha papel crítico na expressão do *HLA-G*, determinando quando e onde ele deve ser expresso (CASTELLI et al., 2014b; GINEAU et al., 2015). Assim como em outros mamíferos, a região LCR controla a expressão de genes ligados a um tecido específico, através da interação com vários elementos reguladores *cis* (LI et al., 2002; SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013).

Foi visto que diversos sítios de variação na 5'URR do *HLA-G* foram descritos, porém, pouco se sabe como estes influenciam a expressão do gene. A eficiência de ligação dos fatores transcripcionais depende da interação entre proteína e sequência de nucleotídeos. Assim, a alteração da expressão pode ser afetada diretamente por mudanças na região promotora que afetam a afinidade dos fatores de transcrição (SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013). Isso tudo demonstra a importância do levantamento de polimorfismos associados ao câncer de mama desse presente estudo, como forma de entender a relação entre alguns polimorfismos e a patologia estudada.

1.2.7 *HLA-G* Associado ao Câncer

Segundo Dias e colaboradores (2015), nas últimas décadas, diversos pesquisadores descrevem a associação do aumento da

expressão do *HLA-G* em diferentes tipos tumorais (DIAS et al., 2015) como, câncer colorretal (YE et al., 2007; ZEESTRATEN et al., 2014), câncer de esôfago (CAO et al., 2011; HU et al., 2013; LIN et al., 2011; ZHENG et al., 2014), carcinoma hepatocelular (LIN et al., 2010; PARK et al., 2012), glioblastoma (KREN et al., 2011) e melanoma (BEZUHLY et al., 2008; FANG; ZHANG; LI, 2008; IBRAHIM et al., 2004). Além desses trabalhos, outros também demonstram o aumento da expressão do *HLA-G* com estágios avançados da doença, maior agressividade tumoral, maior tamanho, presença de metástase entre outras características (DIAS et al., 2015).

O aumento da expressão do *HLA-G*, foi observado em diversos estudos com câncer de mama (CHEN et al., 2010; DE KRUIJF et al., 2010; ELLIOTT et al., 2011; HE et al., 2010; LEFEBVRE et al., 2001; RAMOS et al., 2014; SAYED et al., 2010; SILVA; SLOWIK; BICALHO, 2013). Dois estudos relataram alterações nos níveis de sHLA-G em amostras de câncer de mama. Chen e colaboradores (2010), associaram o aumento dos níveis de sHLA-G com maior agressividade tumoral, enquanto, Sayed e colaboradores (2010), descrevem que os níveis de sHLA-G se apresentaram menores, após a cirurgia de retirada tumoral da mama (CHEN et al., 2010; SAYED et al., 2010).

A expressão de *HLA-G* pelo tumor, o aumento dos níveis de sHLA-G e dos níveis de IL-10 (citocina que induz a expressão de *HLA-G*), estão vinculado com prognóstico ruim, tanto em casos de câncer de mama, como diversos outros cânceres estudados (DIAS et al., 2015).

Em 2014, estudos com câncer de mama não encontraram associação dos polimorfismos da região codificadora do *HLA-G* em amostras brasileiras e coreanas (JEONG et al., 2014; ROLFSEN et al., 2014). Considerando a região 3'UTR, o alelo *14bp Del* e o genótipo *14 pb Del/Del* foram associados com a vulnerabilidade ao câncer de mama no Irã (ESKANDARI-NASAB et al., 2013) e em mulheres coreanas (JEONG et al., 2014).

Admite-se que sítios variáveis da região promotora desempenham importantes papéis na regulação da expressão do *HLA-G* (CASTELLI et al., 2017; CATAMO et al., 2015a; DONADI et al., 2011). Entretanto, poucos estudos demonstram a associação entre sítios polimórficos da 5'URR do *HLA-G* e o risco de desenvolvimento de patologias, como doenças autoimunes (CATAMO et al., 2014, 2015a, 2015b), asma (NICOLAE et al., 2005) e cânceres (CORDEIRO et al., 2017; DONADI et al., 2011).

Até momento não foram publicados estudos que associem os polimorfismos existentes na região promotora do gene *HLA-G* e o

câncer de mama, sendo este o primeiro estudo. Contudo, alguns dados sugerem que variações nesta região estejam associadas a alguns tipos de câncer. Diante disso, torna-se pertinente avaliar se a variabilidade desta região está relacionada à suscetibilidade e agressividade do câncer de mama.

2 JUSTIFICATIVA

Avanços significativos no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no câncer foram obtidos nas últimas décadas. Alguns genes que participam do desenvolvimento tumoral foram identificados, como oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo. Essas descobertas possibilitaram o desenvolvimento de testes moleculares de diagnósticos de pré-disposição hereditária para diferentes tipos de câncer. Entretanto, vários estudos estão sendo realizados na busca de novos marcadores tumorais, com o objetivo de melhorar a detecção precoce e prognóstico clínico, principalmente dos casos esporádicos (cerca de 90% do total).

A molécula HLA-G é classificada como imunomoduladora negativa e associada à tolerância imunológica. Essa característica pode fazer dessa molécula um bom marcador, que indicaria maior agressividade tumoral. Para isso, é preciso entender melhor os mecanismos de regulação da expressão do gene que determina essa molécula.

Nesse contexto, o conhecimento do papel dos polimorfismos na região 5'UR do *HLA-G*, em pacientes com câncer de mama e em mulheres sem a doença, poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos que afetam a ligação dos fatores de transcrição, resultando em alterações na expressão desse gene. Esses resultados poderão também, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas e testes de diagnóstico, prognóstico e terapia para esta patologia.

Assim, o presente estudo tem com hipótese principal a associação de 21 variantes, descritas na região promotora do gene *HLA-G* e aqui estudadas, estão associadas com a presença de câncer de mama (quando comparado com indivíduos sem a doença). Assim como com tipos tumorais mais agressivos e/ou exposição a fatores de risco (quando a comparação ocorre entre subgrupos de pacientes).

3 OBJETIVO

3.1 GERAL

Analisar polimorfismos da região promotora (5'URR) do gene *HLA-G* em mulheres com câncer de mama e em mulheres sem evidência de carcinoma mamário, assim como em subgrupos de pacientes com tumores mais agressivos e/ou presença ou não de fatores de risco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a variabilidade da região 5'URR do gene *HLA-G* em pacientes com câncer de mama e controles.
- Estudar as frequências alélicas e genotípicas dos *loci* polimórficos encontrados na região 5'URR do gene *HLA-G* em pacientes com câncer de mama e em indivíduos-controle.
- Verificar se há associação entre os alelos, genótipos, dados clínicos e epidemiológicos com o câncer de mama.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo é parte do projeto intitulado “Câncer de Mama: busca de microRNAs que controlam a expressão de *HLA-G*, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnóstico e opções terapêuticas”, coordenado pela Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), no parecer nº 922.167, de 07 de dezembro de 2014.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras das pacientes e grupo controle (sangue periférico) haviam sido coletadas em estudo anterior, seu DNA extraído e armazenados no Banco de Amostras do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE – UFSC), coordenado pela Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza, após explicação do projeto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexos A e B).

Os dados familiares e epidemiológicos das mulheres foram obtidos por entrevistas realizadas com questionários estruturados (anexos C e D). Além dos dados disponíveis nos questionários foram considerados os dados coletados nos prontuários das pacientes, incluindo dados clínicos, patológicos e laboratoriais, que foram utilizados nas análises de associação com câncer de mama (Banco de Dados LAPOGE – UFSC).

O estudo foi realizado utilizando amostras biológicas (DNA) de 103 pacientes com câncer de mama, atendidas no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – Universidade Federal de Santa Catarina (HU – UFSC). Paralelamente, foram utilizadas 103 amostras (DNA) de mulheres sem evidência da patologia em estudo, nem histórico familiar, que constituem o grupo controle.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO (gDNA)

Os gDNAs foram previamente extraídos pelo método *SaltingOut*, descrito por Miller e colaboradores (1998) e modificado por Lahiri & Nurnberger (1991) (Protocolo e reagentes anexo E). O DNA foi quantificado por espectrofotometria para verificar a concentração e o

grau de pureza de cada amostra, a partir destes dados, foram feitas soluções de uso na concentração de 20 ng/ μ L (LAHIRI; NURNBERGER, 1991; MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).

4.4 GENOTIPAGEM DA REGIÃO 5'UR DO GENE *HLA-G*

A genotipagem das amostras foi realizada pela amplificação de seqüências-alvo específicas do gene *HLA-G* pela técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região gênica de interesse descrita por Catamo e colaboradores (2015).

4.4.1 Reação em cadeia da polimerase

Reagentes e soluções:

1. Água ultrapura *Mili-Q*[®];
2. dNTPs 0,2 mM de cada (100 mM, *Invitrogen*[®]);
3. MgCl₂ 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 Forward* (montante, F) 10 pmol (5'URR *Forward* 5' - CACGGAAACTTAGGGCTACGG - 3' *IDT*[®]);
6. *Primer Reverse* (jusante, R) 10pmol (5'URR *Reverse* 5' - GCGTCTGGGGAGAATGAGTCC - 3', *IDT*[®]);
7. *Taq DNA Polymerase Platinum* 0,5 U/ μ L (5 U/ μ L; *Invitrogen*[®]).

A amplificação foi padronizada em volume final de 25 μ L, contendo os seguintes volumes finais: 14,5 μ L de água; 1,0 μ L de dNTPs; 0,8 μ L de MgCl₂; 2,5 μ L de Tampão de PCR; 0,5 μ L de *Primer R*; 0,5 μ L de *Primer F*; 0,20 μ L de *Taq Platinum*[®] e adicionados 5,0 μ L de gDNA (20 ng/ μ L) da amostra desejada.

Em toda PCR foi utilizado um controle negativo de amplificação (CN), com água ultrapura ao invés de DNA genômico, para assegurar a ausência de contaminação por DNA exógeno durante a reação.

As amostras foram colocadas em um termociclador (*Termal Cycler, Veriti 96 Well, Applied Biosystems*[®]) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e, em seguida, a 32 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e 15 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.4.2 Análise dos Produtos de Amplificação

Reagentes e soluções

1. Agarose (*UltraPure Agarose, Invitrogen*®);
2. Tampão TBE 10X (Tris base 0,89 M, *Amresco*®; Ácido Bórico 0,89 M, *Vetec*®; EDTA 0,2 M, *Vetec*®);
3. Tampão TBE 0,5X (50 mL do Tampão TBE 10X; 950 mL H₂O).

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose em concentração de 1%. Para o preparo dos géis foram adicionados 40 mL de tampão TBE 0,5X com 0,4 g de agarose. Para a corrida eletroforética foi utilizado tampão TBE 0,5X em temperatura ambiente (TA), 2 µL das amostras amplificadas foram aplicadas no gel e coradas com 0,3 µL de corante fluorescente de ácidos nucleicos (*GelRed*®) e 0,3 µL de solução carreadora.

A corrida eletroforética foi realizada durante 30 minutos e a fonte de eletroforese fixada na voltagem de 100 V. Após, o gel foi submetido à luz ultravioleta (UV) para visualização da região gênica amplificada, tendo posteriormente suas imagens capturadas pelo fotodocumentador *DNR-Bio-Imaging Systems MiniBIS PRO*® através do software *GelCapture*® ou pelo fotodocumentador *ChemiDoc MP* que faz parte do parque de equipamento do LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia) da UFSC, e após foram analisadas.

4.4.3 Purificação dos Produtos Amplificados

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*®).

Os produtos de amplificação foram purificados, adicionando-se em tubo de 0,2 µL (tipo *Eppendorf*), 0,5 µL de Exo, 0,5 µL de SAP, 9 µL de produto da PCR inicial amplificado. As amostras foram levadas ao termociclador e submetidas a um ciclo de 37°C por 60 minutos e 75°C por 15 minutos.

4.4.4 PCR para a Reação de Sequenciamento

Reagentes e Soluções

1. Água Ultrapura *Mili-Q*®;

2. *Primer Forward* 10 pmol (5'URR *Forward* 5' - CACGGAAACTTAGGGCTACGG – 3' *IDT*®);
3. Corante *BigDye*® *Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits* (*Applied Biosystems*®);
4. Tampão *BigDye*® *Terminator Sequencing Buffer 5X* (*Applied Biosystems*®).

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 1,0 µL de *BigDye*®, 1,5 µL do seu respectivo tampão, 1,0 µL do *Primer* 5'URR *Forward* 6,5µL de produto da PCR inicial purificado, completando um volume final de 10 µL em cada reação, aplicado em microplaca de 96 poços *Axygen*®, selado com filme de vedação para microplacas *Axygen*®. A microplaca, contendo as amostras, foi levada ao termociclador (*Termal Cycler, Veriti 96 Well, Applied Biosystems*®) e submetidas as seguintes condições térmicas: 96°C por 10 segundos e, a seguir, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

4.4.5 Precipitação dos Fragmentos Sequenciados

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 (*Merck*®);
3. Etanol 70% (*Merck*®).

A precipitação dos produtos de sequenciamento foi feita adicionando aos 10 µL de reação de sequenciamento, 2,5 µL de EDTA e 25 µL de etanol absoluto TA. Após, a microplaca foi selada e homogeneizada por inversão 4X. Sendo em seguida centrifugada por 45 minutos a 2.880 RCF (4.000 RPM) (*Centrifuge 5804R Eppendorf*®). Posteriormente o sobrenadante foi descartado, adicionado 150 µL de etanol 70% TA, seguido de nova homogeneização e centrifugação por 15 minutos a 2.880 RCF (4.000 RPM). O sobrenadante foi removido por inversão e a placa foi deixada em TA para secar 12h (*overnight*) em local escuro, após, a microplaca foi encaminhado para o sequenciamento.

4.4.6 Sequenciamento das Amostras

Reagentes e Soluções

1. Formamida Hi-Di (*Invitrogen*®).

As amostras foram ressuspensas com 10 µL de Formamida e centrifugadas (*Centrifuge 5804R, Eppendorf*®) a 500 RCF (800 RPM) por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 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 processadas em sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems*®) para obtenção das sequências nucleotídicas, visualizadas por meio de cromatogramas.

4.4.7 Análise das Sequências

As sequências dos cromatogramas de cada amostra foram alinhadas com uma sequência genômica padrão retiradas do GenBank (NCBI Reference Sequence: NG_029039.1) e cada sítio de variação detectado foi anotado individualmente para análises posteriores.

A análise direta das sequências de DNA, da 5'URR, foi realizada, através dos softwares *Chromas Lite*® e *Lasergene*® *SeqMan* (*Expert Analysis Software – DNASTar, Applied Biosystems*®, Inc., EUA) para a investigação de todos os pontos de variação existentes na região desse estudo, composta aproximadamente de 800pb. As variações para essa região, analisados nesse trabalho, estão apresentadas no quadro 3.

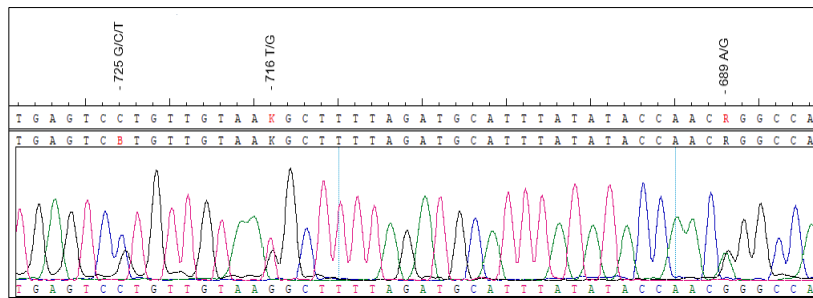
Quadro 3 – Polimorfismos da 5'URR do gene HLA-G analisadas.

SNPId	Posição relatada IMGT/HLA	Alelo referência	Alelo alternativo	SNPId	Posição relatada IMGT/HLA	Alelo referência	Alelo alternativo
rs1632946	-762	C	T	rs1736933	-486	A	C
rs1233334	-725	G	C,T	rs149890776	-483	A	G
rs2249863	-716	T	G	rs1736932	-477	C	G
rs2735022	-689	A	G	rs17875394	-443	G	A
rs35674592	-666	G	T	rs17875395	-400	G	A
rs17875391	-646	A	G	.	-399	G	A
rs1632944	-633	G	A	rs17875396	-391	G	A
rs201221694	-546	A	AG	rs1632943	-369	C	A
rs368205133	-541	GA	G	rs191630481	-355	G	A
.	-540	A	G	rs781618441	-297	G	A
rs112940953	-539	A	G	.	-284	G	A
rs138987412	-521	C	A	rs551170211	-256	TC	T
rs17875393	-509	C	G	rs1233333	-201	G	A

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Foram montadas 3 seqüências no formato FASTA, uma referente a seqüência referência dessa região disponível no GenBank ® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e duas delas com anotação dos códigos IUPAC para cada sítio de variação, sendo que em uma estavam contidas as deleções e na outra as inserções. A identificação dos sítios de variação foi realizada através da comparação com as três seqüências referência montadas e da interpretação dos cromatogramas (Figura5).

Figura 5 - Cromatografia obtida a partir do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Na qual estão evidenciados os SNP -725 G/C/T, -716 T/G e -689 A/G. No cromatograma em questão têm-se os genótipos heterozigotos -725 GC, -716 TG e -689 AG. Código IUPAC: B = G ou C ou T; K = T ou G; R = A ou G.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

4.5 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.5.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Através do programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 4.2 (disponível em <http://genepop.curtin.edu.au/>), foi verificada a aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg. Foram realizados três testes, o primeiro baseado na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, caso a hipótese nula não fosse verificada, duas hipóteses alternativas (H1) poderiam ser verificadas através do teste para detecção da deficiência de heterozigotos e outro 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 H1 de excesso ou de deficiência de heterozigotos, respectivamente.

4.5.2 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/>).

4.5.3 Diferenciação genética dos grupos amostrais

A diferenciação gênica e genotípica entre os grupos, caso e controle, 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.

4.5.4 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 $p \leq 0,05$ 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.

O indicador OR é utilizado 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).

Foi verificada a associação dos alelos e genótipos para todos os polimorfismos, bem como, a análise de modelos de herança com o objetivo de fazer observações mais apuradas dos mecanismos que

envolvem o risco da presença e investigar a penetrância de cada ponto de variação ao câncer de mama.

A penetrância da patologia 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 (CLARKE et al., 2011).

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 (Quadro 4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Quadro 4 – Classificação de grupos por estádios (0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV).

Grupamento por Estádios			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1*	N0	M0
Estádio IIA	T0	N1	M0
	T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estádio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Nota: * T1 inclui o T1mic.

T: extensão do tumor primário; N: número de linfonodos acometidos; M: presença de metástase à distância. Fonte: INCA, 2004.

O dado clínico Grau de Elston-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).

4.5.5 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.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As 206 mulheres que compõem a amostra deste estudo, 103 mulheres com câncer de mama (casos) e 103 mulheres sem diagnóstico de câncer de mama (controles). Os dois grupos, casos e controles, foram caracterizados de acordo com a idade, faixa etária e ancestralidade informada conforme o Quadro 5.

Quadro 5 - Classificação das amostras, 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=103)	Controles (n=103)
Idade (Média ± SD)	55,23 ± 13,63	46,88 ± 16,87
Faixa Etária		
≤ 40 anos	14 (13,59%)	35 (33,98%)
> 40 anos	86 (83,50%)	67 (65,05%)
Não Informado	3 (2,91%)	1 (0,97%)
Ancestralidade Informada		
Eurodescendentes	54 (52,43%)	61 (59,22%)
Afrodescendentes	5 (4,85%)	8 (7,77%)
Ameríndio	2 (1,94%)	–
Euro + Afro	7 (6,80%)	2 (1,94%)
Euro + Afro + Ameríndio	1 (0,97%)	–
Outro	1 (0,97%)	3 (2,91%)
Desconhecido	33 (32,04%)	29 (28,16%)
Total	103 (100%)	103 (100%)

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

As pacientes apresentaram uma média de idade de 55,23 ± 13,63 e o grupo controle 46,88 ± 16,87. Cerca de 13% das mulheres do grupo casos possui 40 anos ou menos e cerca de 83% possuem mais de 40 anos.

As mulheres, casos e controles, foram classificados quanto à ancestralidade (dados informados pelos indivíduos). Na classe

Eurodescendentes o grupo casos apresentou 52,43% do total e o grupo controles 59,22%. A classe Afrodescendentes totalizou 4,85% do grupo casos e 7,77% do grupo controles.

A classificação para tumores de mama, no grupo casos, está apresentada no Quadro 6.

Quadro 6 – Classificação para tumores de mama, de acordo com o local e subtipo.

Classificação	Casos	Frequência
Carcinoma Ductal in situ	3	2,91%
Carcinoma Ductal invasivo	69	66,99%
Carcinoma Lobular in situ	1	0,97%
Carcinoma Lobular invasivo	7	6,80%
Outros	15	14,56%
Não informado	8	7,77%
Total	103	100%

Aproximadamente 70% da amostra têm os tumores originários no epitélio ductal, sendo que o carcinoma ductal invasivo é o mais frequente, 67%. No entanto todas as amostras acima citadas foram consideradas.

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Através da análise das sequências de DNA, da região 5'URR do gene *HLA-G*, foram observados 26 sítios de variação em casos e controles. As posições -546 A/G, -541 G/A, -540 A/G não foram consideradas para as análises estatísticas, pois houve perda de heterozigose, que pode indicar um problema na identificação desta região com InDels. Assim como, os sítios -256 C/T e -201 G/A por perda na qualidade das sequências.

Para os 21 sítios de variação que permaneceram, foram realizadas as seguintes análises estatísticas: equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, frequências alélicas e genotípicas 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

As distribuições das frequências para os sítios polimórficos da 5^ªURR do gene *HLA-G* em casos e controles estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), exceto os *loci* nos grupos de caso e controle: $-539 A/G$, $-509 C/G$, $-486 A/C$, $-483 A/G$, $-399 G/A$, $-391 G/A$, $-355 G/A$, $-297 G/A$, $-284 G/A$ para os grupos caso e controle ($p < 0,001$ para ambos); $-521 C/A$ ($p = 0,037$ e $p < 0,001$, respectivamente), $-443 G/A$ ($p < 0,001$ e $p = 0,002$, respectivamente) e $-369 C/A$ ($p < 0,001$ e $p = 0,027$, respectivamente); para o grupo controle $-689 A/G$ ($p < 0,001$); e para o grupo caso $-477 C/G$ ($p < 0,001$) e $-400 G/A$ ($p < 0,001$); que apresentaram desvio significativo.

5.2.2 Frequências Alélicas e Genotípicas

Os alelos que apresentaram frequência inferior a 1% foram $-725T$ (*locus* trialélico), $-646G$, $-521A$, $-509G$, $-400A$, $-355A$, para ambos os grupos amostrais; $-689G$, $-443A$, $-399A$ e $-391A$ em controles e $-539G$ em casos. Os demais apresentaram todos os seus alelos com frequências polimórficas em ambos os grupos.

Ressaltamos que para um sítio polimórfico apresentou alelos e genótipos mais frequentes diferentes entre os dois grupos. O sítio $-486 A/C$, onde o alelo *A* foi mais frequente em casos (0,515), assim como seu genótipo homocigoto *AA* (0,396), enquanto que em controles foi o alelo *C* (0,607) e o genótipo *CC* (0,534).

Na posição $-762 C/T$, onde considerando os casos o alelo *C* e o genótipo *TC* foram os mais frequentes (0,529 e 0,476, respectivamente) e em controles o alelo *T* (0,529) e o genótipo *TC* (0,588).

A posição $-369 C/A$, apresentou uma diferença entre os genótipos dos grupos, pois o genótipo homocigoto *AA* foi o mais frequente em casos (0,456), entretanto em controles os genótipos homocigotos *AA*, e o heterocigoto *CA* foram os mais frequentes, apresentando a mesma frequência (0,382). Neste caso o alelo *A* foi o mais frequente tanto em casos (0,587), como em controles (0,574).

O *loci* $-509 C/G$ foi o único que apresentou a frequência do alelo *C* e do genótipo *CC* exatamente iguais entre caso e controles (0,950 e 0,931, respectivamente).

Os demais *loci* analisados, o alelo e o genótipo mais frequente foram compartilhados entre os dois grupos, casos e controles, como descritos a seguir:

A posição trialélica -725 G/C/T o alelo C foi o mais frequente tanto em casos como em controles (0,796 e 0,806), assim como, o genótipo CC (0,612 e 0,631). No polimorfismo -689 A/G o alelo A foi o mais frequente (0,636 em casos e 0,942 em controles), assim como o genótipo AA foi o mais frequente em ambos os grupos (0,444 – casos e 0,916 – controles).

O polimorfismo -716 T/G, onde o alelo T foi o mais frequente no grupo casos (0,553), entretanto, para o grupo controle os alelos G e T apresentaram a mesma frequência (0,500), sendo que o genótipo mais frequente em casos e controles foi o TG (0,466 e 0,592, respectivamente). Na posição -666 G/T o alelo G foi o mais frequente tanto em casos (0,563) como em controles (0,510), o genótipo heterozigoto TG foi o mais frequente em ambos os grupos (0,427 – casos e 0,553 – controles).

Para a posição, -646 A/G o alelo A apresentou uma alta frequência em casos e controle (0,917 e 0,995, respectivamente) e o genótipo homozigoto AA foi o mais frequente, tanto em casos (0,835), como em controles (0,990). Os alelos A e G, na posição -633 G/A, em casos apresentaram a mesma frequência (0,500), e em controles o alelo A foi o mais frequente (0,563), o genótipo heterozigoto foi o mais frequente (0,495) para casos e (0,585) para os controles.

Na posição -539 A/G, o alelo A foi o mais frequente, tanto em casos (0,917) como em controles (0,869), assim como o genótipo homozigoto AA (0,883) para casos e (0,793) para controles. No polimorfismo -521 C/A o alelo C foi o mais frequente, tanto em casos (0,907), como em controles (0,913), para o genótipo homozigoto CC as frequências foram maiores para casos (0,843) e controles (0,874).

Para a posição -483 A/G o alelo A foi mais frequente em casos (0,893) e controles (0,806), o genótipo homozigoto AA, foi o mais frequente em casos (0,845) e controles (0,738). O alelo G foi o mais frequente em casos e controles na posição -477 C/G (0,505 e 0,525 respectivamente), o genótipo homozigoto GG foi o mais frequente em casos (0,379) e o genótipo heterozigoto CG (0,422) em controles.

Na posição -443 G/A o alelo G apresentou uma alta frequência em casos (0,850) e controle (0,966), o genótipo homozigoto GG foi o mais frequente tanto em casos (0,806), quanto controles (0,951) para esta posição. O mesmo padrão foi encontrado para a posição -400 G/A, onde o alelo G teve uma alta frequência (0,917 em casos e 0,971 em controles) e o genótipo GG o mais frequente (0,883 – casos e 0,951 – controles).

O alelo *G* também foi o mais frequente para as posições, -399 *G/A* (0,845 em casos e 0,937 em controles) e -391 *G/A* (0,868 em casos e 0,942 em controles), assim como o genótipo homozigoto *GG* foi o mais frequente em ambas as posições (0,816 – casos e 0,922 – controles) e (0,843 – casos e 0,922 – controles). O mesmo para a posição -355 *G/A*, onde o alelo *G* foi o mais frequente, (0,922 em casos e controles), e o genótipo *GG* com frequência de (0,912) em casos e (0,892) em controles.

Ainda para o polimorfismo -297 *G/A* o alelo mais frequente foi o *G* (0,574 para casos e 0,811 para controles) e o genótipo *GG* foi o mais frequente em ambos os grupos, casos (0,549) e controles (0,796). E na posição -284 *G/A*, o alelo *G* apresentou frequência de (0,785) para casos e (0,812) para controles, e o genótipo homozigoto *GG* apresentou frequência (0,730) para casos e (0,782) para controles.

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genóticas de casos e controles, bem como o EHW estão descritos no Quadro 7.

Quadro 7 - Frequências alélicas e genóticas para os grupos casos e controles e valor de p para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) estimadas para os 21 sítios de variações polimórficas considerados no presente estudo.

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-762 C/T (rs1632946)			0,693			0,110
C	109	0,529		96	0,471	
T	97	0,471		108	0,529	
Total de Alelos	206			204		
CC	30	0,291		18	0,176	
TC	49	0,476		60	0,588	
TT	24	0,233		24	0,235	
Total de Indivíduos	103			102		
-725 C/G/T (rs1233334)			0,175			0,937
C	164	0,796		166	0,806	
G	22	0,107		24	0,117	
T	20	0,097		16	0,078	
Total de Alelos	206			206		
CC	63	0,612		65	0,631	
GC	18	0,175		21	0,204	
GG	2	0,019		1	0,010	
TC	20	0,194		15	0,146	
TG	0	0,000		1	0,010	
TT	0	0,000		0	0,000	
Total de Indivíduos	103			103		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-716 G/T (rs2249863)			0,558			0,080
G	92	0,447		103	0,500	
T	114	0,553		103	0,500	
Total de Alelos	206			206		
GG	22	0,214		21	0,204	
TG	48	0,466		61	0,592	
TT	33	0,320		21	0,204	
Total de Indivíduos	103			103		
-689 A/G (rs2735022)			0,083			0,001*
A	126	0,636		179	0,942	
G	72	0,364		11	0,058	
Total de Alelos	198			190		
AA	44	0,444		87	0,916	
GA	38	0,384		5	0,053	
GG	17	0,172		3	0,032	
Total de Indivíduos	99			95		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-666 G/T (rs35674592)			0,223			0,333
G	116	0,563		105	0,510	
T	90	0,437		101	0,490	
Total de Alelos	206			206		
GG	36	0,350		24	0,233	
TG	44	0,427		57	0,553	
TT	23	0,223		22	0,214	
Total de Indivíduos	103			103		
-646 A/G (rs17875391)			1,000			SI
A	189	0,917		205	0,995	
G	17	0,083		1	0,005	
Total de Alelos	206			206		
AA	86	0,835		102	0,990	
GA	17	0,165		1	0,010	
GG	0	0,000		0	0,000	
Total de Indivíduos	103			103		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-633 A/G (rs1632944)			1,000			1,000
A	103	0,500		116	0,563	
G	103	0,500		90	0,437	
Total de Alelos	206			206		
AA	26	0,252		33	0,320	
GA	51	0,495		50	0,485	
GG	26	0,252		20	0,194	
Total de Indivíduos	103			103		
-539 A/G (rs112940953)			<0,001*			<0,001*
A	189	0,917		179	0,869	
G	17	0,083		27	0,131	
Total de Alelos	206			206		
AA	91	0,883		82	0,796	
GA	7	0,068		15	0,146	
GG	5	0,049		6	0,058	
Total de Indivíduos	103			103		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-521 C/A (rs138987412)			0,037*			<0,001*
A	19	0,093		18	0,087	
C	185	0,907		188	0,913	
Total de Alelos	204			206		
AA	3	0,029		5	0,049	
CA	13	0,127		8	0,078	
CC	86	0,843		90	0,874	
Total de Indivíduos	102			103		
-509 C/G (rs17875393)			<0,001*			<0,001*
C	192	0,950		192	0,950	
G	10	0,050		10	0,050	
Total de Alelos	202			202		
CC	94	0,931		94	0,931	
GC	4	0,040		4	0,040	
GG	3	0,030		3	0,030	
Total de Indivíduos	101			101		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-486 A/C (rs1736933)			<0,001*			<0,001*
A	106	0,515		81	0,393	
C	100	0,485		125	0,607	
Total de Alelos	206			206		
AA	38	0,369		33	0,320	
CA	30	0,291		15	0,146	
CC	35	0,340		55	0,534	
Total de Indivíduos	103			103		
-483 A/G (rs149890776)			<0,001*			<0,001*
A	184	0,893		166	0,806	
G	22	0,107		40	0,194	
Total de Alelos	206			206		
AA	87	0,845		76	0,738	
GA	10	0,097		14	0,136	
GG	6	0,058		13	0,126	
Total de Indivíduos	103			103		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-477 C/G (rs1736932)			<0,001*			0,114
C	102	0,495		97	0,475	
G	104	0,505		107	0,525	
Total de Alelos	206			204		
CC	38	0,369		27	0,265	
GC	26	0,252		43	0,422	
GG	39	0,379		32	0,314	
Total de Indivíduos	103			102		
-443 A/G (rs17875394)			<0,001*			0,002*
A	31	0,150		7	0,034	
G	175	0,850		199	0,966	
Total de Alelos	206			206		
AA	11	0,107		2	0,019	
GA	9	0,087		3	0,029	
GG	83	0,806		98	0,951	
Total de Indivíduos	103			103		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-400 G/A (rs17875395)			<0,001*			0,071
A	17	0,083		6	0,029	
G	189	0,917		200	0,971	
Total de Alelos	206			206		
AA	5	0,049		1	0,010	
GA	7	0,068		4	0,039	
GG	91	0,883		98	0,951	
Total de Indivíduos	103			103		
-399 A/G (rs17875396)			<0,001*			<0,001*
A	32	0,155		13	0,063	
G	174	0,845		193	0,937	
Total de Alelos	206			206		
AA	13	0,126		5	0,049	
GA	6	0,058		3	0,029	
GG	84	0,816		95	0,922	
Total de Indivíduos	103			103		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-391 A/G (rs17875396)			<0,001*			<0,001*
A	27	0,132		12	0,058	
G	177	0,868		194	0,942	
Total de Alelos	204			206		
AA	11	0,108		4	0,039	
GA	5	0,049		4	0,039	
GG	86	0,843		95	0,922	
Total de Indivíduos	102			103		
-369 A/C (rs1632943)			<0,001*			0,027*
A	121	0,587		117	0,574	
C	85	0,413		87	0,426	
Total de Alelos	206			204		
AA	47	0,456		39	0,382	
CA	27	0,262		39	0,382	
CC	29	0,282		24	0,235	
Total de Indivíduos	103			102		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-355 A/G (rs191630481)			<0,001*			<0,001*
A	16	0,078		16	0,078	
G	188	0,922		188	0,922	
Total de Alelos	204			204		
AA	7	0,069		5	0,049	
GA	2	0,020		6	0,059	
GG	93	0,912		91	0,892	
Total de Indivíduos	102			102		
-297 A/G (rs781618441)			<0,001*			<0,001*
A	87	0,426		39	0,189	
G	117	0,574		167	0,811	
Total de Alelos	204			206		
AA	41	0,402		18	0,175	
GA	5	0,049		3	0,029	
GG	56	0,549		82	0,796	
Total de Indivíduos	102			103		

Polimorfismo	Caso (n)	Frequência	EHW (p)	Controle (n)	Frequência	EHW (p)
-284 A/G			<0,001*			<0,001*
A	43	0,215		38	0,188	
G	157	0,785		164	0,812	
Total de Alelos	200			202		
AA	19	0,190		16	0,158	
GA	5	0,050		6	0,059	
GG	76	0,760		79	0,782	
Total de Indivíduos	100			101		

Frequências e EHW(GENEPOP); n: número amostral; p: probabilidade; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; SI: sem informação. Valores significativos ($p \leq 0,05$) estão anotados com *.

5.2.3 Diferenciação Genética dos grupos amostrais

A diferenciação genética entre os dois grupos, de casos e de controles, foi testada a partir dos 21 *loci* que permaneceram para as análises do presente estudo. Dos quais nove *loci*, -689 A/G, -646 A/G, -486 A/C, -483 A/G, -443 G/A, -400 G/A, -399 G/A, -391 G/A e -297 G/A apresentaram resultados significativos, diferenciando os dois grupos amostrais em relação à distribuição das frequências alélicas. E cinco, destes nove *loci*, -689 A/G, -646 A/G, -443 G/A, -399 G/A e -297 G/A, diferenciaram as amostras também quando distribuição genotípica foi considerada (Quadro 8).

Quadro 8 - Diferenciação alélica e genotípica nos 21 *loci* estudados.

<i>Loci</i>	Casos x Controles (valores de <i>p</i>)	
	Diferenciação alélica	Diferenciação genotípica
-762 C/T	0,270	0,268
-725 G/C/T	0,783	0,765
-716 T/G	0,318	0,313
-689 A/G	<0,001*	<0,001*
-666 G/T	0,324	0,311
-646 A/G	<0,001*	<0,001*
-633 G/A	0,231	0,241
-539 A/G	0,149	0,219
-521 C/A	0,866	0,885
-509 C/G	1,000	1,000
-486 A/C	0,021*	0,058
-483 A/G	0,020*	0,063
-477 C/G	0,690	0,735
-443 G/A	<0,001*	0,002*
-400 G/A	0,030*	0,080
-399 G/A	0,004*	0,034*
-391 G/A	0,010*	0,059
-369 C/A	0,841	0,863
-355 G/A	1,000	1,000
-297 G/A	<0,001*	<0,001*
-284 G/A	0,517	0,649

Diferenciação alélica e genotípica (GENEPOP - Teste Exato G); *p*: probabilidade. Valores significativos estão anotados com *.

5.2.4 Desequilíbrio de Ligação

A análise das probabilidades de segregação entre os sítios polimórficos foi realizada pelo teste de desequilíbrio de ligação (LD). Os vinte e um sítios polimórficos, considerados par a par, permitiram 210 comparações em ambos os grupos. Dentre essas, foi observado desequilíbrio de ligação ($p \leq 0,05$) entre 93 pares, os outros 117 pares se comportaram como *loci* não ligados ($p > 0,05$). As probabilidades estão descritas no Quadro 9.

Quadro 9 - Probabilidade (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os vinte e um sítios polimórficos detectados nos grupos casos e controles ($p \leq 0,05$).

Loci	-762 C/T	-725 G/C/T	-716 T/G	-689 A/G	-666 G/T	-646 A/G	-633 G/A	-539 A/G	-521 C/A	-509 C/G	-486 A/C	-483 A/G	-477 C/G	-443 G/A	-400 G/A	-399 G/A	-391 G/A	-369 C/A	-355 G/A	-297 G/A	-284 G/A	
-762 C/T	-																					
-725 G/C/T	<0,001*	-																				
-716 T/G	<0,001*	0,002*	-																			
-689 A/G	<0,001*	0,006*	<0,001*	-																		
-666 G/T	<0,001*	0,001*	<0,001*	<0,001*	-																	
-646 A/G	0,776	0,157	0,677	0,528	0,782	-																
-633 G/A	<0,001*	0,002*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,433	-															
-539 A/G	0,006*	0,017*	0,021*	0,354	0,015*	1,000	0,001*	-														
-521 C/A	0,054*	0,079	<0,001*	0,096	0,002*	0,396	0,021*	0,744	-													
-509 C/G	0,684	0,226	0,917	0,934	0,704	0,007*	0,540	0,090	0,005*	-												
-486 A/C	<0,001*	0,236	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,801	<0,001*	0,949	0,326	0,218	-											
-483 A/G	0,576	0,463	0,091	0,609	0,047*	0,773	0,059	<0,001*	0,003*	0,125	0,556	-										
-477 C/G	<0,001*	0,077	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,059	<0,001*	0,405	0,473	0,215	<0,001*	0,546	-									
-443 G/A	0,565	0,183	0,392	0,517	0,206	0,633	0,556	0,341	<0,001*	0,017*	0,494	<0,001*	0,352	-								
-400 G/A	0,139	<0,001*	0,059	0,408	0,112	0,010*	0,165	0,378	<0,001*	<0,001*	0,320	0,045*	0,470	<0,001*	-							
-399 G/A	0,435	<0,001*	0,737	0,990	0,538	0,991	0,321	0,229	<0,001*	0,147	0,693	<0,001*	0,727	0,005*	0,006*	-						
-391 G/A	0,881	0,080	0,348	0,987	0,527	0,009*	0,228	0,981	0,017*	0,039*	0,442	0,062	0,373	<0,001*	0,001*	<0,001*	-					
-369 C/A	<0,001*	0,055*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,607	<0,001*	0,003*	0,581	0,210	<0,001*	0,415	<0,001*	0,140	0,959	0,730	0,010*	-				
-355 G/A	0,272	0,283	0,019*	0,267	0,002*	1,000	0,331	0,675	0,001*	0,066	0,826	0,002*	0,020*	0,016*	0,025*	<0,001*	0,006*	0,001*	-			
-297 G/A	0,901	0,285	0,841	0,963	0,463	0,915	0,936	0,001*	0,001*	0,170	0,011*	0,011*	0,039*	<0,001*	0,110	<0,001*	0,032*	0,306	0,111	-		
-284 G/A	0,591	0,326	0,994	0,322	0,938	0,099	0,601	0,210	0,044*	0,108	0,651	0,465	0,061	0,007*	0,566	0,593	0,014*	0,777	<0,001*	<0,001*	-	

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

5.2.5 Análises de Associação

Os resultados obtidos após os cálculos de associação considerando cada um dos 21 *loci* analisados neste trabalho estão descritos no Apêndice A. Foram observadas associações significativas para risco de desenvolvimento de câncer de mama em 9 sítios analisados.

Cinco sítios apresentaram associação alélica e genotípica. O sítio $-689 A/G$ apresentou associação de risco com o alelo G (OR=9,299) e com os genótipos que contém esse alelo, tanto homozigoto GG (OR=6,359), quando heterozigoto GA (OR=11,213). Dois sítios analisados apresentaram associação de risco com o alelo e o genótipo homozigoto para o alelo, sendo eles o $-297 G/A$ com o alelo A (OR=3,184) e o genótipo AA (OR=3,174) e o $-443 G/A$ com o alelo A (OR=5,036) e genótipo AA (OR=6,038). E outros dois polimorfismos apresentaram associação com o alelo e o genótipo heterozigoto, o $-646 A/G$ com o alelo G (OR=18,439) e o genótipo GA (OR=20,163) e o $-486 A/C$ com o alelo A (OR=1,636) e o genótipo CA (OR=2,411).

Quatro sítios analisados apresentaram associação alélica de risco, o $-483 A/G$ com o alelo A (OR=2,015), $-400 G/A$ com o alelo A (OR=2,998), $-399 G/A$ com o alelo A (OR=2,730) e $-391 G/A$ com o alelo A (OR=2,466).

Os polimorfismos e os valores de *Odds Ratio* (OR) citados, assim como o Intervalo de Confiança (IC) e o valor de p estão destacados no Quadro 10 com asterisco (*).

Quadro 10 - Cálculos de associação (OR) entre a presença de um alelo e/ou genótipo e o desenvolvimento do câncer de mama para nove dos 21 loci averiguados no presente estudo, com seus respectivos valores de intervalo de confiança (IC 95%) e de *p*.

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	<i>p</i> value
-689 A/G (rs2735022)					
G	72	11	9,299	4,561-19,394	<0,001*
GA	38	5	11,213	3,925-34,489	<0,001*
GG	17	3	6,358	1,672-28,366	0,003*
-646 A/G (rs17875391)					
G	17	1	18,439	2,559-379,775	0,001*
GA	17	1	20,163	2,740-419,741	<0,001*
-486 A/C (rs1736933)					
A	106	81	1,636	1,086-2,466	0,018*
CA	30	15	2,411	1,146-5,116	0,018*
-483 A/G (rs149890776)					
A	184	166	2,015	1,112-3,670	0,019*

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p value
-443 A/G (rs17875394)					
A	31	7	5,036	2,055-12,890	<0,001*
AA	11	2	6,038	1,216-40,525	0,022*
-400 A/G (rs17875395)					
A	17	6	2,998	1,084-8,703	0,032*
-399 A/G (rs17875396)					
A	32	13	2,730	1,330-5,683	0,005*
-391 A/G (rs17875396)					
A	27	12	2,466	1,157-5,334	0,017*
-297 A/G (rs781618441)					
A	87	39	3,184	1,993-5,099	<0,001*
AA	41	18	3,174	1,592-6,372	<0,001*

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

Foi realizada a análise de modelos de herança dos polimorfismos (Apêndice B) com o objetivo de identificar a influência dos diferentes modelos e o desenvolvimento do câncer de mama. Quatro modelos foram analisados, o modelo multiplicativo, aditivo, dominante comum e recessivo comum.

Encontrou-se associação de risco com 11 loci. Cinco deles apresentaram resultados de associação para os quatro modelos de herança testados, $-689 A/G$ (alelo *G*), $-443 G/A$ (alelo *A*), $-400 G/A$ (alelo *A*), $-399 G/A$ (alelo *A*) e $-297 G/A$ (alelo *A*). Três sítios apresentaram resultados de associação para três modelos, sendo que o $-646 A/G$ (alelo *G*) e $-486 A/C$ (alelo *A*) para os modelos multiplicativo, aditivo e dominante comum, e o $-391 G/A$ (alelo *A*) para os modelos de herança, multiplicativo, aditivo e recessivo comum. Por fim, três polimorfismos apresentaram resultados de associação de risco de seu alelo com câncer de mama para um único modelo, $-762 C/T$ (alelo *C*) e $-716 T/G$ (alelo *T*) com o modelo recessivo comum e o $-725 G/C/T$ (alelo *T*) modelo aditivo.

Os polimorfismos e os valores de *Odds Ratio* (OR) citados, assim como o Intervalo de Confiança (IC) e o valor de *p* estão destacados no Quadro 11.

Quadro 11 - 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 (IC 95%) e de p para OR.

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
	-762 C/T (rs1632946)					
Recessivo Comum	(CC x γ) versus (CT + TT)	38	23	1,340	0,998-1,718	0,052*
	-725 G/C/T (rs1233334)					
Aditivo	(2 x TT + TC) x γ versus CC	25	19	2,866	1,162-7,226	0,020*
	-716 T/G (rs2249863)					
Recessivo Comum	(TTx γ) versus (GT + GG)	41	26	1,847	0,988-3,463	0,055*
	-689 A/G (rs2735022)					
Multiplicativo	(γ^2 x GG)+ (γ x AG) versus AA	1823	305,5	11,818	7,933-17,640	<0,001*
Aditivo	(2 x GG+ AG) x γ versus AA	669,5	52,5	25,438	15,679-41,413	<0,001*
Recessivo Comum	(GG x γ) versus (AG + AA)	158	28	6,331	3,734-10,785	<0,001*
Dominante Comum	(GG + AG) x γ versus AA	511	74,4	13,654	8,627-21,666	<0,001*
	-646 A/G (rs17875391)					
Multiplicativo	(γ^2 x GG)+ (γ x AG) versus AA	313	18	20,624	11,485-37,424	<0,001*
Aditivo	(2 x GG + AG) x γ versus AA	313	18	20,624	11,485-37,424	<0,001*
Dominante Comum	(GG + AG) x γ versus AA	313	18	20,624	11,485-37,424	<0,001*

	-486 A/C (rs1736933)					
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AC) \text{ versus } CC$	151	113	2,100	1,252-3,528	0,004*
Aditivo	$(2 \times AA + AC) \times \gamma \text{ versus } CC$	125	90	2,183	1,281-3,726	0,004*
Dominante Comum	$(AA + AC) \times \gamma \text{ versus } CC$	87	78	1,753	1,006-3,059	0,047*
	-443 G/A (rs17875394)					
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$	324	66	5,796	3,835-8,773	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	67	19	4,164	2,231-7,832	<0,001*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$	55	10	6,038	2,777-13,449	<0,001*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	56	17	3,889	2,018-7,565	<0,001*
	-400 G/A (rs17875395)					
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$	66	9	7,897	3,553-18,084	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	31	14	2,385	1,136-5,058	0,019*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$	15	3	5,204	1,357-23,369	0,011*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	26	13	2,154	0,990-4,738	0,053*
	-399 G/A					
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$	113	45	2,840	1,761-4,589	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	42	18	2,639	1,354-5,180	0,004*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$	35	13	2,932	1,390-6,263	0,004*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	29	13	2,523	1,169-5,507	0,016*

	-391 G/A (rs17875396)					
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	79	34	2,567	1,518-4,353	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	34	18	2,087	1,051-4,169	0,034*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	27	10	2,937	1,274-6,908	0,009*
	-297 G/A (rs781618441)					
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	432	192	3,295	2,215-4,905	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	98	45	3,189	1,898-5,369	<0,001*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	130	57	3,178	1,971-5,132	<0,001*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma$ versus GG	57	27	3,091	1,683-5,701	<0,001*

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

Os resultados obtidos para os cálculos de associação com os dados epidemiológicos, considerados como fatores de risco para o desenvolvimento da doença (1) Índice de Massa Corpórea (IMC) (2) hábito tabagista, (3) menopausa tardia (após os 50 anos de idade), (4) uso de anticoncepcional por 5 anos ou mais e (5) uso de terapia de reposição hormonal (TRH) por 5 anos ou mais, estão representados no Quadro 12, com os referidos valores de OR, IC e *p*. Entre os dados apresentados foram encontradas associações com a não utilização de anticoncepcional e terapia de reposição hormonal por 5 anos ou mais (OR=2,683 e OR=4,789, respectivamente).

Quadro 12 - 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 IC e p.

Dados Epidemiológicos	Casos (n=103)	Controles (n=103)	OR	IC	<i>p</i> value
IMC					
<18,5 (baixo peso)	2 (2,08%)	2 (2,98%)	0,691	0,068-7,074	1,000
≥18,5 e <25 (adequado)	35 (36,46%)	19 (28,36%)	1,450	0,701-3,011	0,362
≥25 e <30 (sobrepeso)	36 (37,50%)	28 (41,79%)	0,836	0,420-1,662	0,697
≥30 (obesidade)	23 (23,96%)	18 (26,87%)	0,858	0,395-1,864	0,812
Total	96 (100%)	67 (100%)			
Não informado	7	36			
Hábito Tabagista					
Fumante	36 (36,00%)	26 (35,14%)	1,038	0,529-2,043	1,000
Não Fumante	64 (64,00%)	48 (64,86%)	0,963	0,489-1,892	1,000
Total	100 (100%)	74 (100%)			
Não informado	3	29			

Idade da Menopausa					
≥50 anos	26 (44,07%)	19 (46,34%)	0,912	0,379-2,195	0,984
<50 anos	33 (55,93%)	22 (53,66%)	1,096	0,456-2,638	0,984
Total	59 (100%)	41 (100%)			
Não Iniciaram Menopausa	39	21			
Não informado	5	41			
Uso de Anticoncepcional (≥5 anos)					
Sim	41 (42,71%)	38 (66,67%)	0,373	0,177-0,778	0,007*
Não	55 (57,29%)	19 (33,33%)	2,683	1,285-5,638	0,007*
Total	96 (100%)	57 (100%)			
Não informado	7	46			
Uso deTRH (≥5 anos)					
Sim	5 (5,21%)	10 (20,83%)	0,209	0,057-0,725	0,010*
Não	91 (94,79%)	38 (79,17%)	4,789	1,380-17,430	0,010*
Total	96 (100%)	48 (100%)			
Não informado	7	55			

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

Os dados clínicos TNM e Grau de Elston-Ellis foram considerados como fatores de risco para a gravidade do câncer de mama. É importante ressaltar que a classificação dos tumores malignos TNM é aplicável somente para carcinomas e deve haver a confirmação histológica da doença. Assim, neste estudo foi utilizado o TNM patológico, onde T é a classificação do tumor primário, N é o número de linfonodos com metástase e M é metástase à distância. Foram realizadas análises de associação entre os estádios I (n=13), II (n=14) e III (n=68), todos os resultados obtidos estão representados no Apêndice C.

Foi verificado valor de p significativo para os loci $-725 G/C/T$ do alelo T e do genótipo TC na comparação estágio II *versus* I, com o valor de OR menor que 0,001 para ambos. O mesmo ocorreu no locus $-689 A/G$, no genótipo GA na comparação do estágio III *versus* I (OR=0,013;), genótipo AA, GA e GG na comparação do estágio III *versus* II (OR=0,083, OR=0,055 e OR=0,037, respectivamente).

Para o locus $-399 G/A$, o alelo A foi associado ao risco na comparação estágio III *versus* II, (OR=13,000; IC=1,671-127,248; $p=0,008$) e uma associação de risco do alelo G comparando estágio II *versus* I (OR=5,778; IC=0,949-44,932; $p=0,059$). Para o polimorfismo $-391 G/A$ foi encontrada uma associação de risco para o alelo A (OR=8,667;), nos estádios III *versus* II.

Os dados, com os valores de *Odds Ratio* (OR) citados, incluindo intervalo de confiança (IC) e valores de p , estão representados no Quadro 13.

Quadro 13 - Valores significativos das análises de associação (OR), com seus respectivos valores de CI e p, para a classificação TNM entre os estádios I, II e III em mulheres com câncer de mama para os polimorfismos 5'UUR do gene HLA-G.

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	p value
-399 G/A (rs17875396)					
G	26	18	5,778	0,949-44,932	0,059♦
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	p value
A	6	2	13,000	1,671-127,248	0,008*
-391 G/A (rs17875396)					
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	p value
A	4	2	8,667	0,986-92,738	0,052♦

Análises de associação (HDS Epimax); n: número amostral; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade. Valores significativos ($p \leq 0,05$) estão anotados com * e valores ($p < 0,06$ e $p > 0,05$) com ♦.

Neste estudo, ainda foi considerado como fator de risco para a gravidade do câncer de mama, o dado clínico grau histológico combinado de Nottingham (Scarff, Bloom, Richardson modificado por Elston-Ellis). Quase 50% da amostra de câncer de mama analisada para este fator de risco apresentam Grau de Elston-Ellis II. O Quadro 14 apresenta as frequências dos grupos (Graus I, II e III).

Quadro 14 - Frequências do dado clínico Grau de Elston-Ellis analisadas em mulheres com câncer de mama.

Grau de Elston-Ellis	Número	Frequência
I	12	17,14%
II	33	47,14%
III	25	35,71%
Total	70	100%
Não informado	33	

Todos os resultados do dado clínico Grau de Elston-Ellis, obtidos após as análises de associação, estão representados no Apêndice D.

Na análise de associação utilizando as diferentes combinações de Grau de Elston-Ellis foram positivas para três polimorfismos, podendo ser com alelos e/ou genótipos. Para o *-762 C/T* foi encontrada associação de risco para o genótipo *TC*, utilizando Grau II *versus* I (OR=6,786) e Grau II+III *versus* I (OR=5,741). Na posição *-509 C/G* foi encontrada associação de risco utilizando Grau II *versus* I, para o alelo *C* (OR=833,000) e genótipo *CC* (OR=295,000), utilizando Grau III *versus* I, para o alelo *C* (OR=665,000), genótipo *CC* (OR=235,000), utilizando o Grau II+III *versus* Grau I, o alelo *C* (OR=802,846), genótipo *CC* (OR=291,667). E para o polimorfismo *-443 G/A* foi encontrada uma associação de risco para o alelo *A*, utilizando Grau II *versus* I (OR=14,748;).

Os dados, com os valores de OR, incluindo IC e p, estão representados no Quadro 15.

Quadro 15 – Valores significativos das análises de associação de risco (OR) entre os 3 tipos de Grau de Elston-Ellis (Grau I, Grau II e Grau III), e seus valores de IC e *p*, em mulheres com câncer de mama.

-762 C/T	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i> value
TC	19	2	6,786	1,099-53,62	0,036*
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i> value
TC	31	2	5,741	1,031-41,81	0,045*
-509 C/G	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i> value
C	59	0	833,000	44,865-511805,06	<0,001*
CC	29	0	295,000	13,000-199561,05	<0,001*
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i> value
C	47	0	665,000	35,603-409442,38	<0,001*
CC	23	0	235,000	10,229-159647,54	<0,001*
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i> value
C	47	59	7,169	1,906-31,717	0,002*
CC	23	29	5,552	1,030-39,535	0,045*
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i> value
C	106	0	802,846	52,026-456437,04	<0,001*
CC	52	0	291,667	16,127-176324,45	<0,001*
-443 G/A	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i> value
A	15	0	14,748	1,089-8030,41	0,038*

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

Dos vinte e um polimorfismos analisados neste estudo, treze apresentaram associação em um ou mais modelos de análises de associação de risco de desenvolvimento de câncer de mama. O resumo dos dados das associações encontradas está apresentado no Quadro 16.

Quadro 16 – Resumo comparativo das análises que apresentaram resultados significativos, associados com risco de desenvolvimento de câncer de mama.

Polimorfismo	Análise de Associação		Modelo de Herança	TNM	Grau de Elston-Ellis	
	Alelo	Genótipo	Genótipo	Alelo	Alelo	Genótipo
-762 C/T			CC			TC
-725 G/C/T			TT			
-716 T/G			TT			
-689 A/G	G	GA	GG			
-646 A/G	G	GA	GG			
-509 C/G					C	CC
-486 A/C	A	CA	AA			
-483 A/G	A					
-443 G/A	A	AA	AA		A	
-400 G/A	A		AA			
-399 G/A	A		AA	A		
-391 G/A	A		AA	A		
-297 G/A	A	AA	AA			

Resultados baseados nas análises de associação (HDS Epimax). Considerando os valores significativos $p \leq 0,005$.

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, sendo o carcinoma ductal invasivo o mais comum, representando 80% dos casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; INCA, 2015). Deve-se salientar que fatores de risco como envelhecimento, exposição prolongada a elevados níveis dos hormônios estrogênio e progesterona, além da relação da exposição ao tabaco e sobrepeso (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; INCA, 2015; TORRE et al., 2017), podem interagir com fatores ambientais genéticos e imunológicos, caracterizando-o como uma doença multifatorial (INCA, 2015).

A capacidade do crescimento tumoral e disseminação metastática são reguladas por alguns genes que estão envolvidos com a resposta imune (LU; FINN, 2008), entre eles está o *HLA-G*, que apresenta SNVs que participam da regulação dos níveis de transcrição, possivelmente pela interferência na ligação dos fatores de transcrição (AMODIO; SALES DE ALBUQUERQUE; GREGORI, 2014; CASTELLI et al., 2014b).

Os resultados do presente estudo apontam que há SNVs na região promotora, que participam na ligação dos fatores de transcrição aos elementos regulatórios, estão associados ao risco de desenvolvimento do câncer de mama.

6.1 CARACTERIZAÇÃO EPIMIOLÓGICA E GENÉTICA

Sabe-se que o câncer de mama é considerado uma doença multifatorial, e são várias as causas envolvidas no aumento das chances de desenvolver esta patologia. Ser mulher é o primeiro fator de risco, seguido da idade, cuja taxa de incidência da doença cresce rápido e progressivamente após os 40 anos (INCA, 2015; STEWART; WILD, 2014). No presente trabalho, a grande maioria das pacientes com câncer de mama apresentou faixa etária maior de 40 anos (83,50%), estando os resultados de acordo com a incidência mundial.

A diferença entre as médias de idade nos dois grupos amostrais não interfere de forma negativa nas análises estatísticas. Isso porque, essa diferença se dá por um maior número de mulheres com idade mais avançada no grupo controle (não afetada pela doença). E, como dito anteriormente, a suscetibilidade ao câncer, incluindo câncer de mama, aumenta com a idade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Da mesma forma, uma média de idade maior, bem como um maior número de mulheres com idade avançada no grupo controle fortifica a análise, pois diminui a probabilidade de falso negativo para a doença, visto que mulheres jovens poderão ainda apresentar a mesma probabilidade com o passar da idade. Assim, se houvesse um número maior de mulheres com menos de 40 anos no controle, quando comparássemos os dois grupos, poderíamos considerar que as mesmas ainda não se encontram em idade de risco para a doença, o que não ocorre, sendo elas mais velhas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; STEWART; WILD, 2014).

Outra característica analisada foi à ancestralidade informada. A estruturação do território catarinense se caracteriza por singularidades de seu histórico de colonização, que iniciou com a ocupação vicentista-açoriana, seguida da população alemã-italiana, entre outros povos, predominantemente europeus (TORRES et al., 2014; CORREA, 1999).

Tanto as pacientes quanto as mulheres que compõe o grupo controle, informaram a ancestralidade Eurodescendente como predominante (52,43% dos casos e 59,22% dos controles). As frequências de Afrodescendentes, Ameríndios, bem como o conjunto dos dois principais componentes (Euro+Afrodescendentes) e dos três componentes (Euro+Afro+Ameríndiosdescendentes) estiveram presentes, mas foram menores. Esses dados estão de acordo com a literatura, tanto no que diz respeito à colonização de Santa Catarina, onde as amostras foram coletadas, quanto à informação dada para a população brasileira, considerada uma das mais heterogêneas do mundo, com diferentes percentuais dos três grupos que originaram a população, dependendo da região (MARRERO et al., 2007). É relevante destacar que muitas mulheres não souberam informar sua ancestralidade (32% em casos e 28% no controle).

Segundo a classificação para tumores de mama (4ª ed. da OMS) (LAKHANI et al., 2012), a maioria, aproximadamente 80%, inicia-se no epitélio ductal e são conhecidos como carcinoma ductal invasivo. O presente estudo demonstrou que a maioria dos tumores de mama analisados, tem essa mesma origem, sendo o carcinoma ductal invasivo o mais frequente (66,99%). Assim, nossos resultados corroboram com os dados da literatura, sendo este o tumor maligno mais frequente, e líder de causa de mortes em todo o mundo (RAMOS et al., 2014).

As distribuições das frequências para os 21 SNVs da 5^ªURR do gene *HLA-G* analisados em casos e controles, apresentaram desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em 15 *loci*,

evidenciando que as frequências alélicas destes sítios não seguem as premissas do EHW.

Essas alterações podem ocorrer devido à ação de fatores evolutivos ou endocruzamento, sendo geralmente a deriva a principal causa, considerando que número amostral possa ser pequeno. A estratificação populacional parece ser a principal hipótese, porém é necessária a análise de marcadores de ancestralidade, que garantiriam a homogeneidade genética entre as amostras e/ou verificariam subestruturarão amostral. Outro estudo, feito com esses mesmos sítios, também apresentou desvios do EHW em oito *loci*, os erros de genotipagem, amostras não randômicas e deriva genética foram descartados. Sendo a explicação mais plausível também a estratificação populacional (CATAMO et al., 2014). Porém, quase não há estudos com estes marcadores em amostras de pacientes para que possamos comparar.

As análises de diferenciação genética entre os grupos, considerando a distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos nove *loci* analisados, apresentaram resultados significativos, indicando que há diferenciação genética entre casos e controles. Resultado esse, que pode ser um indício de que há polimorfismos que possam estar associados à condição de risco ao câncer de mama. Podendo também ser essa associação uma explicação para os desvios do EHW.

O entendimento do papel regulatório da região promotora do gene *HLA-G*, associado a algumas doenças ainda não é bem conhecido (CASTELLI et al., 2014b; CATAMO et al., 2017). A associação não aleatória de dois ou mais *loci*, isto é ligados, é descrita entre antígenos e alelos nos *loci* de HLA clássicos. As combinações alélicas não são independentes, diante disso, a análise de desequilíbrio de ligação auxilia na compreensão dos efeitos das combinações alélicas em determinada população ou grupos (PIRRI et al., 2009).

Acredita-se que os sítios de variação de 5'URR podem afetar a expressão do *HLA-G* (BERGER et al., 2010). Essa região apresenta padrão de variação caracterizada por três linhagens divergentes, duas provavelmente devido à seleção balanceadora (DONADI et al., 2011; MARTINEZ-LASO et al., 2013).

Embora grande parte dos sítios de variação não esteja dentro de elementos regulatórios conhecidos, a seleção balanceadora mantém os haplótipos da região promotora divergentes e com alta heterozigose. No entanto, a maioria dos sítios variáveis está em desequilíbrio de ligação (CASTELLI et al., 2014b).

Contudo, o padrão de desequilíbrio de ligação observado para 5'URR se estende para a região codificante e 3'UTR do *HLA-G*. Castelli e colaboradores (2017), em estudo com duas populações (Brasil e Chipre), detectou baixa variabilidade das proteínas de *HLA-G*, possivelmente pelo efeito carona, devido ao desequilíbrio de ligação entre a 5'URR e o segmento codificante (CASTELLI et al., 2017).

Outros estudos afirmam que polimorfismos da 5'URR do *HLA-G* podem estar em desequilíbrio de ligação com as variantes da 3'UTR, influenciando o *splicing* alternativo e a estabilidade do mRNA (AGRAWAL et al., 2015; AUBOEUF, 2002; CASTELLI et al., 2011; MISRA et al., 2013; NICOLAE et al., 2005; ROUSSEAU et al., 2003; TAN; SHON; OBER, 2005).

No presente trabalho foi observado desequilíbrio de ligação ($p \leq 0,05$) entre 93 pares de *loci*. Essa associação estatística entre os pares dos *loci* da promotora do *HLA-G* podem, de alguma maneira ainda não descrita, alterar a ligação dos fatores de transcrição (CASTELLI et al., 2014b).

6.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO

As taxas de incidência de câncer de mama, a partir da década de 1980, aumentaram cerca de 30% nos países ocidentais, principalmente aumento da expectativa de vida, disponibilidade de rastreamento da doença, alterações nos padrões reprodutivos, bem como, pelo uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal (ALTHUIS et al., 2005; TORRE et al., 2016; YOULDEN et al., 2012).

O tempo de exposição do tecido mamário aos hormônios está associado ao aumento da incidência do desenvolvimento da patologia. É bem estabelecida a relação do histórico hormonal e reprodutivo na etiologia do câncer de mama. Mulheres que possuem exposição prolongada aos hormônios estrogênio e progesterona apresentam risco elevado de desenvolver a doença, pois estes atuam estimulando a proliferação celular e, conseqüentemente, aumento do tumor (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; INCA, 2015; STEWART; WILD, 2014).

Apesar dessa relação com exposição a hormônios, no presente trabalho não foram encontrados associação quando os grupos casos e controles foram comparados com à menopausa tardia.

Sabe-se que o uso de hormônios sintéticos à base de estrógeno ou combinados de estrógeno e progesterona como, contraceptivos orais e

terapia de reposição hormonal, são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. O uso destes, por cinco anos ou mais, causam aumento dos níveis hormonais, elevando as probabilidades do desenvolvimento da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; INCA, 2014).

Os resultados do presente estudo, referentes ao uso de hormônios sintéticos, foram contraditórios com a literatura. Tanto o não uso de anticoncepcional, como a ausência da terapia de reposição hormonal, apresentaram associação de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (OR=2,683 e OR=4,789, respectivamente). Sabe-se que o uso de contraceptivos orais está associado com a redução do risco dos cânceres de ovário e endométrio, entretanto, são risco para o desenvolvimento de câncer de mama, notavelmente entre mulheres jovens, e câncer cervical (STEWART; WILD, 2014).

Como a faixa etária predominante neste estudo é composta por mulheres com 40 anos ou mais, e não temos seguimento do uso de hormônios, não é possível sugerir o papel dos hormônios sintéticos como agente protetivo. Da mesma forma, não é possível afirmar qual é a influência da terapia de reposição hormonal, devido ao tamanho amostral restrito de mulheres que fazem uso desta (5 mulheres em casos e 10 em controle), sendo necessária análise mais aprofundada e com maior tamanho amostral, para ambos os fatores de risco acima citados.

Considerados como fatores de risco potencialmente modificáveis, estão o hábito tabagista e a obesidade. A respeito dos hábitos tabagistas, sabe-se que este contém inúmeras substâncias carcinógenas associadas com câncer de pulmão, brônquios, estômago, fígado, esôfago, entre outros (TORRE et al., 2016; UENO et al., 2012). Embora os dados da literatura sejam contraditórios para afirmar a associação entre o uso de cigarro e câncer de mama, alguns estudos recentes apontam para esta associação, principalmente quando a mulher fumou por um longo tempo ou fumou durante muitos anos antes da primeira gravidez (CATSBURG; MILLER; ROHAN, 2015; DOSSUS et al., 2014). Porém, no presente estudo não foi encontrada associação entre o hábito tabagista e o câncer de mama.

A associação entre a obesidade e o câncer de mama é aceita como fator de risco para o início, crescimento e progressão tumoral, entretanto, os mecanismos moleculares desta associação, bem como o papel dos receptores hormonais, são incertos (ALLOTT et al., 2016; CHAN; NORAT, 2015; HOWELL et al., 2014; JEONG et al., 2014). Essa associação também não foi confirmada no presente estudo.

O *HLA-G* apresenta um padrão de expressão que permite a modulação das células do sistema imunológico. Diante de algumas condições patológicas ocorre o aumento da expressão do gene, bem como, os polimorfismos do gene podem influenciar os mecanismos de regulação transcricionais e pós-transcricional (CASTELLI et al., 2014b; DONADI et al., 2011; KOWAL et al., 2015; MISRA et al., 2013).

Os níveis da molécula *HLA-G* podem ser alterados pela presença de variações, que atuam nas regiões dos elementos regulatórios alterando a afinidade de ligação dos correspondentes fatores de transcrição (DONADI et al., 2011; CASTELLI et al., 2014b).

É inquestionável que variações na região promotora do *HLA-G* modificam a afinidade pelos fatores transcricionais e suas subunidades, porém, até o momento são poucos os trabalhos que apresentam associação desta região com suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças. Catamo e colaboradores descrevem a associação da promotora com o desenvolvimento de doença celíaca, infecção pelo vírus da hepatite C, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (CATAMO et al., 2014, 2015a, 2015b, 2017). Esses polimorfismos também são associados com aborto espontâneo (AGRAWAL et al., 2015; OBER et al., 2003), câncer de pulmão (KOWAL et al., 2015), doença renal (MISRA et al., 2013), esclerose múltipla (WIŚNIEWSKI et al., 2010) e câncer de colo do útero (STAFFEN, C. F., 2017, dados não publicados).

Visto que, até a presente data não foram publicados estudos que descrevem a associação da 5'URR com o risco do desenvolvimento do câncer de mama, na tentativa de relacionar o papel do gene *HLA-G*, neste trabalho, foram realizadas análise de associação com 21 sítios polimórficos, que estão dentro ou próximos de conhecidos ou prováveis elementos reguladores da transcrição.

No presente estudo foram identificados 12 sítios polimórficos (-762 C/T, -725 G/C/T, -716 T/G, -689 A/G, -646 A/G, -486 A/C, -483 A/G, -443 G/A, -400 G/A, -399 G/A, -391 G/A e -297 G/A), associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama. Após a análise de associação dos alelos e genótipos, bem como, o modelo de herança observado em casos e controles.

Como visto nos resultados, foram encontradas associações de risco para o desenvolvimento de câncer de mama para o sítio polimórfico -689 A/G com o alelo G, o genótipos heterozigoto GA e homozigoto GG. Esse sítio, ainda de função desconhecida, encontra-se em uma região localizada entre os elementos reguladores da transcrição GAS (não funcional) e o elemento de choque térmico (HSE). Em estudo de associação, caso e controle, esse *locus* alelo G, foi associado com

efeito protetivo para o desenvolvimento de artrite reumatóide (CATAMO et al., 2014), associado com alterações hematológicas (lúpus) (CATAMO et al., 2015a) e de risco ao desenvolvimento de câncer de colo do útero (STAFFEN, C. F., 2017, dados não publicados).

A análise dos demais sítios -646 A/G, -486 A/C e -483 A/G, que também estão localizados entre os elementos reguladores da transcrição GAS (não funcional) e ao HSE, também apresentou associação significativa. Para a posição -646 A/G a associação foi com o alelo G e o genótipos GA e GG. Os mesmos alelos e genótipos foram associados ao risco de desenvolvimento de câncer de colo do útero (STAFFEN, C. F., 2017, dados não publicados). Esses dados podem sugerir a investigação do alelo G e aumentos nos níveis de HLA-G, associados ao sexo feminino.

No sítio -486 A/C o alelo A e os genótipos CA e AA apresentaram associação de risco. Em câncer de colo do útero o genótipo CA também foi associado ao risco (STAFFEN, C. F., 2017, dados não publicados). Em artrite reumatoide o alelo C foi associado a um efeito protetivo (CATAMO et al., 2014). Esse sítio também foi associado com risco em doença renal em estágio terminal (MISRA et al., 2013), aborto espontâneo (BERGER et al., 2010), e alterações hematológicas em lúpus (CATAMO et al., 2015a), porém nesses artigos citados, não é possível identificar o alelo de risco, apenas o *locus* que tem associação.

Na posição -483 A/G, o alelo A foi associado ao risco de desenvolvimento de câncer de mama. Neste mesmo sítio, o alelo A e genótipo AA, estão associados ao risco em câncer de colo do útero (STAFFEN, C. F., 2017, dados não publicados).

Para os três sítios acima citados, o efeito funcional destes polimorfismos ainda é desconhecido, mas sabe-se que eles estão localizados próximos a sítios chave para a transcrição do gene (CASTELLI et al., 2011, 2014b).

Ainda, o alelo A e o genótipo AA, foram associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama, nos sítios -400 G/A, -399 G/A e -391 G/A. Staffen C. F. (2017, dados não publicados) encontrou associação de risco para o câncer de colo do útero, nas mesmas posições, alelo e genótipo. Catamo e colaboradores (2017) encontraram uma maior frequência dos polimorfismos -400 e -399 em pacientes com hepatite C (CATAMO et al., 2017) e os sítios -400 e -391 com alterações imunológicas (lúpus) (CATAMO et al., 2015a), porém nos artigos não é possível identificar o alelo de risco, apenas quais *loci* tem associação.

O elemento regulatório alternativo próximo a esses sítios é o HSE, responsivo as proteínas HSP, cuja indução por estresse é um potente componente que modula a resposta imune (CASTELLI et al., 2014b; IBRAHIM et al., 2000). Portanto, acredita-se que os polimorfismos próximos ao HSE podem alterar a afinidade de ligação das proteínas HSP e assim, alterar o nível transcricional do gene.

Foi encontrada associação significativa de risco para o desenvolvimento do câncer de mama na posição -297 G/A, as análises demonstraram associação com o alelo A e o genótipo AA. Esse sítio localiza-se próximo ao elemento responsivo a hipóxia (HRE), e um aumento dos níveis transcricionais do *HLA-G* associado com a hipóxia foi identificado em uma série de linhagens tumorais HLA-G-negativos (CHANG, 2003; CHANG; FERRONE, 2003; MOUILLOT et al., 2007). Entretanto, ainda não é conhecida a funcionalidade deste elemento (CHANG; FERRONE, 2003).

O sítio de variação na posição -762 C/T está localizado entre os elementos regulatórios CRE e ISRE da promotora do *HLA-G*, cuja função é desconhecida (CASTELLI et al., 2014b). Foi encontrado associação do genótipo CC com suscetibilidade para o desenvolvimento da doença. Catamo e colaboradores (2014 e 2105) encontraram o alelo T associado, com efeito protetivo, para o desenvolvimento de artrite reumatóide (CATAMO et al., 2014), e o *locus* associado com alterações hematológicas (lúpus) (CATAMO et al., 2015a).

O polimorfismo para a posição trialélica -725 G/C/T da região promotora está localizado próximo ao elemento GAS (CASTELLI et al., 2014b). Ober et al., 2006, verificou significativo aumento nos níveis de expressão da molécula, com a presença do alelo G (CASTELLI et al., 2014b; DONADI et al., 2011; OBER et al., 2006). Entretanto, um estudo realizado por Moreau et al., 2003, identificou que a presença do mesmo alelo G, poderia criar um dinucleotídeo CpG que inibiria a ligação do fator regulador interferon 1 (IRF-1) ao motivo ISRE, devido ao aumento da metilação, gerando assim, a redução da transcrição do *HLA-G* (MOREAU et al., 2003).

Somado a essas observações, o alelo -725 G tem sido associado com aborto espontâneo (OBER et al., 2003), doença renal em estágio terminal (MISRA et al., 2013), artrite reumatoide (CATAMO et al., 2014) e câncer de colo do útero (STAFFEN, C. F., 2017, dado não publicado). Enquanto o alelo -725 C tem sido reportado como fator protetivo em pacientes com esclerose múltipla (WIŚNIEWSKI et al., 2010). O alelo -725 T foi mais frequente em pacientes com hepatite C em comparação aos controles não infectados (CATAMO et al., 2017).

No presente trabalho foi encontrada associação significativa somente com o alelo T para o modelo de herança aditivo, onde os genótipos *TT* + *TC* versus *CC* apresentaram risco ao câncer de mama.

Ainda próximo aos elementos reguladores GAS e ao HSE temos o sítio -716 T/G. Em nosso estudo, o genótipo *TT* foi associado ao risco para câncer de mama. Esse mesmo genótipo foi associado com altos níveis do HLA-G solúvel (CARLINI et al., 2013; REBMANN et al., 2016), sendo esse aumento de HLA-G solúvel também associado ao câncer de mama (YAN, 2011; ZIDI et al., 2015), o que corrobora o resultado aqui apresentado.

Somado a isso, Kowal e colaboradores (2015) constataram que pacientes homocigotos *TT* com quimioterapia possuem menor chance de reagir com regressão em câncer de pulmão (KOWAL et al., 2015). Assim como, Catamo e colaboradores (2014) encontraram associação do alelo *T* com artrite reumatoide (CATAMO et al., 2014). Ainda, Wisniewski e colaboradores (2010), não encontraram associação significativa para esse *locus*, porém, foi constatada uma maior porcentagem de heterocigotos *TG* em controles e pacientes com a forma recidiva da esclerose múltipla (WIŚNIEWSKI et al., 2010). E o alelo G foi associado com alterações hematológicas (lúpus) (CATAMO et al., 2015a).

Próximo ao HSE também está localizado o SNP -443 G/A, foram encontradas associação de risco para o desenvolvimento do câncer de mama para o alelo A e genótipo AA. Mesma associação foi encontrada para o câncer de colo do útero (STAFFEN, C. F., 2017, dados não publicados). É importante ressaltar que até o momento esse sítio foi associado a dois cânceres femininos, sugerindo uma investigação do alelo A e aumentos nos níveis de HLA-G, incluindo resposta a elementos de choque térmico.

Em resumo, uma vez que, a região promotora possui elementos regulatórios da transcrição do gene, os diferentes alelos e genótipos identificados neste trabalho, com destaque para os SNVs -762 C/T, -725 G/C/T, -716 T/G, -443 G/A e -297 G/A, por estarem próximos ou em regiões conhecidas como regulatórias, terem associação de risco com algumas doenças e no presente estudo com câncer de mama, podem estar envolvidos na interferência da ligação dos fatores de transcrição do gene *HLA-G*.

Análises futuras podem contribuir no entendimento dos mecanismos de ação desses sítios, bem como, o envolvimento deles em um possível aumento da expressão da molécula e consequente

diminuição da resposta imune, elevando o risco do desenvolvimento do câncer de mama.

Considerando os estágios dado clínico de TNM (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004), foi encontrada associação aproximada para o polimorfismo -399 G/A para a presença do alelo G quando comparado o estágio II *versus* I, e associação significativa para o alelo A na comparação do estágio III *versus* II. Também foi encontrada associação significativa na comparação dos estádios III *versus* II para o polimorfismo -391 G/A, alelo A. Ainda não há dados publicados relacionando o dado clínico TNM, e seus estágios, a polimorfismos da região promotora do *HLA-G*.

Analisando os dados genéticos e clínicos para o Grau de Elston-Ellis, encontramos associação de risco para o polimorfismo -762 C/T quando comparados os grupos II e I e grau II + III *versus* I, mulheres que apresentam o genótipo heterozigoto TC possuem risco seis vezes maior de desenvolver câncer de mama grau II e risco cinco vezes maior de desenvolver câncer de mama grau II e III em comparação ao grau I.

Considerando o polimorfismo -509 C/G quando comparados os grupos II e I, as mulheres que apresentaram o alelo C e o genótipo CC tiveram associação de risco de desenvolver câncer de mama grau II. A mesma associação foi encontrada quando comparados os grupos III e I, e na comparação grau III *versus* I + II. Assim o C e genótipo CC foram associados ao risco de câncer de mama, assim como aos graus mais altos da doença.

Para a posição -443 G/A, as mulheres portadoras do alelo A possuem chance de risco 14 vezes maior de desenvolver câncer de mama grau II, quando comparado com mulheres que possuem o alelo G.

Até o presente momento, não há dados na literatura que comparem os polimorfismos da região promotora do gene *HLA-G* com o Grau de Elston-Ellis associados com câncer.

A divisão dos casos de câncer em estádios/grupos reflete o fato de que casos nos quais a doença é localizada as taxas de sobrevida são maiores, do que aqueles nos quais a doença se estende além do órgão de origem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). As análises dos dados de diagnóstico associadas aos polimorfismos aqui estudados, e com risco de desenvolvimento de câncer de mama, podem refletir o papel do *HLA-G* na taxa de crescimento, extensão e tipo tumoral, bem como ajudar na indicação do prognóstico e planejamento do tratamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises e interpretação dos dados das possíveis associações entre os polimorfismos da 5'URR do gene *HLA-G* com câncer de mama, pode-se considerar que:

Foi realizado levantamento da variabilidade da 5'URR através do sequenciamento da região, assim como, foram calculadas as frequências alélicas e genóticas para 21 sítios de variação da referida região.

Além disso, foram calculadas as frequências alélicas e genóticas dos *loci* para os grupos de pacientes com câncer de mama e controles, que apresentam diferenciação genética (alélica e genotípica).

Considerando os dados obtidos, foram observadas associações de risco para o desenvolvimento do câncer de mama nos seguintes SNVs: -762 C/T, -725 G/C/T, -716 T/G, -689 A/G, -646 A/G, -486 A/C, -483 A/G, -443 G/A, -400 G/A, -399 G/A, -391 G/A e -297 G/A.

Considerando os dados clínicos, a classificação dos tumores malignos TNM apresentou associação de risco do alelo A para as posições -399 G/A e -391 G/A, na comparação do estágio III *versus* II, e associação de risco do alelo G para a posição -399 G/A, com significância aproximada, comparando estágio II *versus* I.

Com relação ao Grau de Elston-Ellis foi encontrada associação de risco para as posições -762 C/T no genótipo TC, utilizando Grau II *versus* I e Grau II+III *versus* I. Na posição -509 C/G para o alelo C e genótipo CC utilizando Grau II *versus* I, Grau III *versus* I, Grau III *versus* I+II, Grau II+III *versus* I. E para o polimorfismo -443 G/A o alelo A, utilizando Grau II *versus* I.

A região 5'URR alvo desse estudo, é uma importante região de regulação dos níveis de transcrição do *HLA-G*. Os SNVs presentes nessa região parecem atuar nessa regulação, pois podem interferir na ligação dos fatores de transcrição. Assim, esses polimorfismos, associados ao câncer de mama, podem ter impacto relevante na regulação da expressão do gene, aumentando sua expressão e consequentemente permitindo escape tumoral. Isso fica ainda mais pertinente quando essas variações estão descritas dentro, ou próximos de conhecidos ou prováveis sítios de elementos reguladores da transcrição.

De forma geral, a análise dessa região permitiu relacioná-la ao câncer de mama, bem como, com as informações epidemiológicas e clínicas. Considerando os dados obtidos podemos dizer que 12 SNVs localizados próximos a elementos regulatórios da região promotora

estão envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, corroborando a hipótese deste trabalho.

Entretanto, novas análises, como a análise de haplótipos, podem auxiliar no entendimento mais profundo sobre a ação dos SNVs na ligação dos fatores de transcrição sobre essa região. Assim como, estudos futuros relacionando os polimorfismos e hapótipos das regiões reguladoras do gene *HLA-G*, 5'URR e 3'UTR, poderão gerar informações que levem a uma melhor compreensão da ação destas regiões na afinidade por elementos regulatórios como os fatores de transcrição e microRNAs respectivamente, entendendo a influência conjunta dessas regiões reguladoras e a quantidade do produto final da molécula HLA-G.

REFERÊNCIAS

- 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, p. 68–74, 2015.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Elsevier Brasil, 2015.
- AGRAWAL, D. et al. Implication of HLA-G 5' upstream regulatory region polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortions. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 82–91, 2015.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of The Cell**. Sixth edit. New York. Garland Science, 2015.
- ALEGRE, E. et al. **Some basic aspects of HLA-G biology** **Journal of Immunology Research**, 2014.
- ALLOTT, E. H. et al. HHS Public Access. v. 22, n. 6, p. 1–37, 2016.
- ALTHUIS, M. D. et al. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. **International Journal of Epidemiology**, v. 34, n. 2, p. 405–412, 2005.
- ALVAREZ, M. et al. 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. 361–366, 2009.
- AMBS, S. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 5, p. 5–7, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2014. **Cancer Facts and Figures**, p. 1–72, 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2015. **Cancer Facts & Figures 2015**, p. 1–9, 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer; What is breast cancer? **American Cancer Society**, p. 1–127, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2017**. Atlanta: American Cancer Society, 2017.
- AMODIO, G.; SALES DE ALBUQUERQUE, R.; GREGORI, S. **New insights into HLA-G mediated tolerance** **Tissue Antigens**, 2014.
- ANJOS, J. C. DOS; ALAYALA, A.; HÖFELMANN, D. A. Fatores associados ao câncer de mama em mulheres de uma cidade do Sul do Brasil: estudo caso-controlado. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 20, n. 3, p. 341–350, 2012.
- ANOTHASINTAWEE, T. et al. Risk Factors of Breast Cancer. **Asia**

- Pacific Journal of Public Health**, v. 25, n. 5, p. 368–387, 2013.
- ASSI, H. A. et al. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. **Journal of thoracic disease**, v. 5 Suppl 1, p. S2-8, 2013.
- AUBOEUUF, D. Coordinate Regulation of Transcription and Splicing by Steroid Receptor Coregulators. **Science**, v. 298, n. 5592, p. 416–419, 2002.
- BACH, F. H. Genetics of transplantation: the major histocompatibility complex. **Annual review of genetics**, v. 10, n. 1, p. 319-339, 1976.
- BELL, D. W. Our changing view of the genomic landscape of cancer. **Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 231–243, 2010.
- BERGER, D. S. et al. Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 17, n. 4, p. 331–338, 2010.
- BEZUHLY, M. et al. Quantitative HLA-G expression in metastasising and non-metastasising primary thin cutaneous melanomas. **Dermatology**, v. 217, p. 281–283, 2008.
- BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359–70, 2014.
- BLANKENSTEIN, T. et al. The determinants of tumour immunogenicity. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 307–313, 2012.
- BORRELLO, M. G.; DEGL’INNOCENTI, D.; PIEROTTI, M. A. Inflammation and cancer: The oncogene-driven connection. **Cancer Letters**, v. 267, n. 2, p. 262–270, 2008.
- BOYD, N. F. et al. Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 16, p. 1224–1237, 2010.
- BROWN, S. B.; HANKINSON, S. E. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. **Steroids**, n. Part A, p. 8–10, 2014.
- BUTNER, JOSEPH D.; CRISTINI, VITTORIO; WANG, ZHIHUI. Development of a three dimensional, lattice-free multiscale model of the mammary terminal end bud. In: **Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2016 IEEE 38th Annual International Conference of the. IEEE**, 2016. p. 6134-6137.
- CAMPA, D. et al. Genetic risk variants associated with in situ breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 82, p. 1–10, 2015.
- CAMPBELL, E. C.; ANTONY, N.; POWIS, S. J. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. p. 380–384, 2012.
- CANADIAN CANCER SOCIETY. 2017. The breasts. Disponível em :

<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/the-breasts/?region=on> .Acesso em 18 de maio de 2017.

- CAO, M. et al. Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. **Tissue Antigens**, v. 78, n. 2, p. 120–128, 2011.
- CARLINI, F. et al. HLA-G UTR haplotype conservation in the Malian population: Association with soluble HLA-G. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule Review in translational hematology Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862–4870, 2008.
- CAROSELLA, E. D. et al. The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis. p. 353–368, 2011.
- CASTELLI, E. C. et al. The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v. 11, n. 2, p. 134–141, 2010.
- CASTELLI, E. C. et al. 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. 3069–3086, 2011.
- CASTELLI, E. C. et al. Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, 2014a.
- CASTELLI, E. C. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **Journal of Immunology Research**, v.2014, 2014b.
- CASTELLI, E. C. et al. HLA-G variability and haplotypes detected by massively parallel sequencing procedures in the geographically distinct population samples of Brazil and Cyprus. **Molecular Immunology**, v. 83, p. 115–126, 2017.
- CATAMO, E. et al. HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 3, p. 308–315, 2014.
- CATAMO, E. et al. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 85, n. 6, p. 458–465, 2015a.
- CATAMO, E. et al. HLA-G and susceptibility to develop celiac disease.

- Human Immunology**, v. 76, n. 1, p. 36–41, 2015b.
- CATAMO, E. et al. HLA-G regulatory polymorphisms are associated with susceptibility to HCV infection. **Hla**, v. 89, n. 3, p. 135–142, 2017.
- CATSBURG, C.; MILLER, A. B.; ROHAN, T. E. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2204–2209, 2015.
- CHAN, D. S. M.; NORAT, T. Obesity and Breast Cancer: Not Only a Risk Factor of the Disease. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 16, n. 5, 2015.
- CHANG, C. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. **Human Immunology**, v. 8859, n. 3, 2003.
- CHANG, C. C.; FERRONE, S. HLA-G in melanoma: Can the current controversies be solved? **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, n. 5, p. 361–369, 2003.
- CHEN, H.-X. et al. Upregulation of human leukocyte antigen-G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. **Human immunology**, v. 71, n. 9, p. 892–898, 2010.
- CHEN, S.; PARMIGIANI, G. NIH Public Access. **Anal chim Acta**, v. 605, n. 1, p. 70–79, 2008.
- CLARKE, G. M. et al. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nature protocols**, v. 6, n. 2, p. 121–133, 2011.
- CONTINI, P. et al. Soluble HLA-A , -B , -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8 + cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. p. 125–134, 2003.
- CORDEIRO, J. C. et al. A pilot study on Hla-G locus control region haplotypes and cervical intraepithelial neoplasias. **Human Immunology**, v. 78, n. 3, p. 281–286, 2017.
- CURIGLIANO, G. et al. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 20, p. 5564–71, 2013.
- DE KRUIJF, E. M. et al. 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. **J Immunol**, v. 185, n. 12, p. 7452–7459, 2010.
- DE VISSER, K. E.; COUSSENS, L. M. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 11, p. 1143–1152, 2005.
- DIAS, F. C. et al. The role of HLA-G molecule and HLA-G gene

- polymorphisms in tumors, viral hepatitis, and parasitic diseases. **Frontiers in Immunology**, 2015.
- DISCORDE, M. LE et al. Expression of HLA-G in Human Cornea , an Immune-Privileged Tissue. 2003.
- DOHERTY, P. C.; ZINKERNAGEL, R. M. A biological role for the major histocompatibility antigens. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7922, p. 1406–9, 1975.
- DONADI, E. A. Como Entender a Nomenclatura E Os Mecanismos De Associação Entre Os Antígenos E Os Alelos De. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, v. 33, n. 1, p. 7–18, 2000.
- DONADI, E. A. et al. 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. 369–395, 2011.
- DOSSUS, L. et al. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: Results from the EPIC cohort. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 8, p. 1871–1888, 2014.
- DUFLOTH, R. M. et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 123, n. 4, p. 192–197, 2005.
- ECCLES, D. et al. Prospective study of Outcomes in Sporadic versus Hereditary breast cancer (POSH): study protocol. **BMC cancer**, v. 7, p. 160, 2007.
- ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2015.
- ELLIOTT, R. L. et al. Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 26, n. 2, p. 153–157, 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. 403–410, 1991.
- EMBL-EBI European Molecular Biology Laboratory. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/> Acessado em: junho de 2017.
- ESKANDARI-NASAB, E. et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 13, n. 4, p. 253–259, 2013.
- 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 Science**, v. 28, n. 2, p. 219–221, 2008.
- FAURE, M.; LONG, E. O. KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory Potential. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 6208–6214, 2002.
- FAVIER, B.; LEMAULT, J.; ROUAS-FREISS, N. *et al.* Research on HLA-G: an update. **Tissue antigens**, v. 69, n. 3, p. 207-11, 2007.
- FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.
- GARCÍA-OBREGÓN, S. *et al.* 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. 483–491, 2011.
- GHONCHEH, M.; MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiology, Incidence and Mortality of Breast Cancer in Asia. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 17, p. 47–52, 2016.
- GILL, T. J.; CRAMER, D. V.; KUNZ, H. W. The major histocompatibility complex--comparison in the mouse, man, and the rat. A review. **The American journal of pathology**, v. 90, n. 3, p. 737, 1978.
- GINEAU, L. *et al.* Balancing immunity and tolerance: genetic footprint of natural selection in the transcriptional regulatory region of HLA-G. **Genes Immun**, v. 16, n. 1, p. 57–70, 2015.
- GOBIN, S. J. *et al.* The role of enhancer A in the locus-specific transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes by nuclear factor kappa B. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 5, p. 2276–83, 1998.
- GOBIN, S. J. P. *et al.* Transcriptional regulation of HLA-G. **Transplantation Proceedings**, v. 31, n. 4, p. 1857–1859, 1999.
- GOBIN, S. J. P.; VAN DEN ELSEN, P. J. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F and HLA-G. **Human Immunology**, v. 61, n. 11, p. 1102–1107, 2000.
- GONZÁLEZ, Á. *et al.* The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 49, n. January, p. 63–84, 2012.
- GRADISHAR WJ; *et al.* The NCCN. Invasive breast cancer: Clinical practice guidelines in oncologyTM. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 5, n. 3, p. 246–312, 2016.

- GREGORI, S. et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10 – dependent ILT4 / HLA-G pathway. *v. 116, n. 6, p. 935–945, 2010.*
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, *v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.*
- HARVIE, M.; HOWELL, A.; EVANS, D. G. **Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence?** American Society of Clinical Oncology Educational Book, Estados Unidos, *v. 35, p. 66-73, 2015.*
- HE, X. et al. HLA-G Expression in Human Breast Cancer : Implications for Diagnosis and Prognosis , and Effect on Allogeneic Lymphocyte Response After Hormone Treatment In Vitro. **Ann Surg Oncol**, *v. 17, p. 1459–1469, 2010.*
- HEALTH DECISION STRATEGIES. **EpiMax Table Calculator**. Disponível em: <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>. Acessado em: julho de 2017.
- HORTON, R. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, *v. 5, n. 12, p. 889–899, 2004.*
- HOWELL, A. et al. Risk determination and prevention of breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, *v. 16, n. 5, p. 446, 2014.*
- HOWELL, W. M.; CARTER, V.; CLARK, B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. **Journal of Clinical Pathology**, *v. 63, n. 5, p. 387–390, 2010.*
- HU, J. et al. 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.*
- HUNT, J. S. et al. The role of HLA-G in human pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, *v. 4 Suppl 1, n. S10, 2006.*
- HUZELL, L. et al. History of oral contraceptive use in breast cancer patients: impact on prognosis and endocrine treatment response. **Breast Cancer Research and Treatment**, *v. 149, n. 2, p. 505–515, 2015.*
- HVIID, T. V. F. et al. Polymorphism in the 5' Upstream Regulatory and 3' Untranslated Regions of the HLA-G Gene in Relation to Soluble HLA-G and IL-10 Expression. **Human Immunology**, *v. 67, n. 1–2, p. 53–62, 2006.*
- IBRAHIM, E. C. et al. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell

- lines. **Cell Stress & Chaperones**, v. 5, n. 3, p. 207–218, 2000.
- IBRAHIM, E. C. et al. 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. 243–250, 2004.
- INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2014.
- INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2015.
- INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do Câncer Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2012.
- INMAN, J. L., ROBERTSON, C., MOTT, J. D., & BISSELL, M. J. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development**, v. 142, n. 6, p. 1028-1042, 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Flando sobre cancer mama - OMS PARTE 1. **INCA**, p. 12–13, 2002.
- INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECT (IMGT/HLA Database). Disponível em: <
<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>>. Acesso em: junho de 2017.
- JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009.
- JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics: 2011. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.
- JEONG, S. et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA System - Second of Two Parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. September 2000, p. 1–10, 2000.
- KOVATS, S. et al. A Class I Antigen , HLA-G , Expressed in Human Trophoblasts. **Science, New Series**, v. 248, n. 4952, p. 220–223, 1990.
- KOWAL, A. et al. Human leukocyte antigen (HLA)-G gene polymorphism in patients with non-small cell lung cancer. **Thoracic Cancer**, v. 6, n. 5, p. 613–619, 2015.
- KREN, L. et al. 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. 129–134, 2011.
- KUERSTEN, S.; GOODWIN, E. B. The power of the 3' UTR: translational control and development. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 8, p. 626–637, 2003.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid no-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.
- LAKHANI, S. R. et al. (Ed.) **WHO classification of tumours of the breast**. 4. ed. Lyon:IARC, 2012.
- LANFRANCHI, A. Normal breast physiology: the reasons hormonal contraceptives and induced abortion increase breast-cancer risk. **Issues in law & medicine**, v. 29, n. 1, p. 135–146, 2014.
- LARSEN, M. H. et al. The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: Revisited. **Tissue Antigens**, v. 75, n. 3, p. 253–261, 2010.
- LEE, E. H. et al. Effect of BRCA1/2 mutation on short-term and long-term breast cancer survival: A systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 1, p. 11–25, 2010.
- LEFEBVRE, S. et al. Modulation of HLA-G Expression in Human Thymic and Amniotic Epithelial Cells. **Human Immunology**, v. 8859, n. 61, p. 1095–1101, 2000.
- LEFEBVRE, S. et al. A Specific Interferon (IFN)-stimulated Response Element of the Distal HLA-G Promoter Binds IFN-regulatory Factor 1 and Mediates Enhancement of This Nonclassical Class I Gene by IFN- β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6133–6139, 2001.
- LEMAOULT, J. et al. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. v. 109, n. 5, p. 2040–2049, 2007.
- LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. Immunotolerogenic functions of HLA-G: Relevance in transplantation and oncology. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 8, p. 503–509, 2005.
- LEWIN, B. **Genes IX**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- LI, Q. et al. Review article Locus control regions. **Blood**, v. 100, n. 9, p. 3077–3086, 2002.
- LIN, A. et al. Aberrant human leucocyte antigen-G expression and its clinical relevance in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 8, p. 2162–2171, 2010.

- LIN, A. et al. Human leukocyte antigen-G expression is associated with a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 129, n. 6, p. 1382–1390, 2011.
- LU, B.; FINN, O. J. T-cell death and cancer immune tolerance. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 70–79, 2008.
- MACKAY, I. R.; WHITTINGHAM, S.; TAIT, B. Genetic control of immune responsiveness in man. **Vox sanguinis**, v. 32, n. 1, p. 10-19, 1977.
- MANAVATHI, B.; SAMANTHAPUDI, V. S. K.; GAJULAPALLI, V. N. R. Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, n. August, p. 1–13, 2014.
- MARRERO, A. R. et al. Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: The case of the Gaucho from southern Brazil. **Human Heredity**, v. 64, n. 3, p. 160–171, 2007.
- MARTINEZ-LASO, J. et al. Promoter sequences confirm the three different evolutionary lineages described for HLA-G. **Human Immunology**, v. 74, n. 3, p. 383–388, 2013.
- MCLORNAN, D. P.; LIST, A.; MUFTI, G. J. Applying Synthetic Lethality for the Selective Targeting of Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 18, p. 1725–1735, 2009.
- MEHRA, N. K. **The HLA complex in biology and medicine: a resource book**. Boydell & Brewer Ltd, 2010.
- MEIER-ABT, F.; BENTIREN-ALJ, M. How pregnancy at early age protects against breast cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 3, p. 143–153, 2014.
- MENIER, C. et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood Journal**, v. 104, n. 10, p. 3153–3161, 2004.
- 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.
- MINAMI, A. et al. Connection between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair. **Frontiers in oncology**, v. 4, n. November, p. 318, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Classificação de Tumores Malignos**. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- MISRA, M. K. et al. Association of HLA-G promoter and 14-bp insertion-deletion variants with acute allograft rejection and end-

- stage renal disease. **Tissue Antigens**, v. 82, n. 5, p. 317–326, 2013.
- MOREAU, P. et al. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1191–1196, 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. 9 B, p. 2973–2989, 2009.
- MOUILLOT, G. et al. Hypoxia Modulates HLA-G Gene Expression in Tumor Cells. **Human Immunology**, v. 68, n. 4, p. 277–285, 2007.
- MOURA-GALLO, C. V. DE et al. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 2, p. 167–175, 2004.
- NAJI, A. et al. Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. v. 192, p. 1536–1546, 2014.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) at the NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/>>. Acessado em: junho de 2017.
- NGUYEN-LEFEBVRE, A. T. et al. Mouse models for studies of HLA-G functions in basic science and pre-clinical research. **Human Immunology**, v. 77, n. 9, p. 711–719, 2016.
- NICOLAE, D. et al. Fine Mapping and Positional Candidate Studies Identify HLA-G as an Asthma Susceptibility Gene on Chromosome 6p21. n. Ld, p. 349–357, 2005.
- NILSSON, L. L. et al. Distribution of HLA-G extended haplotypes and one HLA-E polymorphism in a large-scale study of mother-child dyads with and without severe preeclampsia and eclampsia. **HLA : immune response genetics**, v. 88, n. 4, p. 172–186, 2016.
- OBER, C. et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 6, p. 1425–1435, 2003.
- OBER, C. et al. The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. **Human Reproduction**, v. 21, n. 7, p. 1743–1748, 2006.
- PARHAM, P. et al. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. p. 800–811, 2012.
- PARK, Y. et al. Soluble human leukocyte antigen-G expression in hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma. **Tissue**

- Antigens**, v. 79, n. 2, p. 97–103, 2012.
- PETRUCELLI, N.; DALY, M. B.; PAL, T. **BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer**. 1998 Sep 4 [Updated 2016 Dec 15]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247>
- PIRRI, A. et al. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. **Transplant Immunology**, v. 20, n. 3, p. 143–149, 2009.
- PUPPO, F. et al. Soluble HLA Class I Molecules / CD8 Ligation Trigger Apoptosis of CD8 + Cells by Fas / Fas- Ligand Interaction. p. 421–423, 2002.
- PURCELL, Anthony W.; ELLIOTT, Tim. Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 1, p. 75-81, 2008.
- RAKHA, E. A. et al. Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 19, p. 3153–3158, 2008.
- RAMOS, C. S. et al. Analysis of HLA-G gene polymorphism and protein expression in invasive breast ductal carcinoma. **Human Immunology**, v. 75, n. 7, p. 667–672, 2014.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENESPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. v. 86, p. 239, 1995.
- REBMANN, V. et al. The potential of HLA-G-bearing extracellular vesicles as a future element in HLA-G immune biology. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–8, 2016.
- RIZZO, R. et al. HLA-G molecules in autoimmune diseases and infections. **Frontiers in Immunology**, v.5, 2014.
- ROCHA, Nuno; NEEFJES, Jacques. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. **The EMBO journal**, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2008.
- ROLFSEN, G. B. et al. HLA-G polymorphism and breast cancer. **International Journal of Immunogenetics**, v. 41, n. 2, p. 143–148, 2014.
- ROUAS-FREISS, N. et al. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11520–5, 1997.
- ROUSSEAU, P. et al. 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. 1005–1010, 2003.
- ROUSSEAU, P. et al. In vivo, RFX5 binds differently to the human leucocyte antigen-E, -F, and -G gene promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. **Immunology**, v. 111, n. 1, p. 53–65, 2004.
- SANTIAGO, M. DE O.; GUEDES, V. R.; PRANCHEVICIUS, M. C. DA S. REVIEW ARTICLE - PERFIL IMUNOFENOTÍPICO, COM FATOR PROGNOSTICO NO CANCER DE MAMA. p. 21–26, 2014.
- SAYED, D. et al. HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. **Tissue Antigens**, v. 75, n. 1, p. 40–47, 2010.
- SGAMBATO, A.; CITTADINI, A. Inflammation and cancer: A multifaceted link. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 4, p. 263–268, 2010.
- SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1291–1299, 2015.
- SILVA, J. S. DA; SLOWIK, R.; BICALHO, M. DA G. Considerations on regulatory sequences of the distal promoter region of the HLA-G gene. **Human Immunology**, v. 74, n. 4, p. 473–477, 2013.
- STAFFEN, C. F. Polimorfismos da Região Promotora (5'URR) do Gene *HLA-G* em Pacientes com Lesões de Colo do Útero. 2017. 194 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2017.
- STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer Report 2014. **International Agency for Research on Cancer**, n. 1, p. 630, 2014.
- SULLIVAN, L. C. et al. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. v. 27, n. 9, 2006.
- TAN, Z.; SHON, A. M.; OBER, C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. v. 14, n. 23, p. 3619–3628, 2005.
- 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. 101–116, 2009.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 1, p. 16–27, 2016.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer in women: Burden and trends. **American Cancer Society Intramural Research**, v. 26, n. 4, p.

- 444–457, 2017.
- TORRES, S. R. et al. Population genetic data and forensic parameters of 30 autosomal InDel markers in Santa Catarina State population, Southern Brazil. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 8, p. 5429–5433, 2014.
- UENO, T. et al. Impact of age on epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 78, n. 3, p. 207–11, 2012.
- 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.
- VASCONCELOS, A. M. N.; GOMES, M. M. F. Transição demográfica: a experiência brasileira. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 539–548, 2012.
- VARNER, VICTOR D.; NELSON, CELESTE M. Cellular and physical mechanisms of branching morphogenesis. **Development**, v. 141, n. 14, p. 2750–2759, 2014.
- VEN, K. VAN DER; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G Polymorphisms and Molecule Function — Questions and More Questions — A Review. p. 86–92, 2000.
- WALQUIRIA KRUGER CORREA. **Considerações sobre a formação territorial e econômica de SC**, 1999.
- WIŚNIEWSKI, A. et al. Association of the HLA-G gene polymorphism with multiple sclerosis in a Polish population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, n. 4, p. 307–311, 2010.
- WOOD, L. D. et al. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. **Science**, v. 318, p. 1108–1113, 2007.
- WOOLF, B. ON ESTIMATING THE RELATION BETWEEN BLOOD GROUP AND DISEASE. **Annals of Human Genetics**, v. 19, n. 4, p. 251–253, 1955.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**. Washington DC: AICR, 2007.
- YAN, W. H. Human leukocyte antigen-G in cancer: Are they clinically relevant? **Cancer Letters**, v. 311, n. 2, p. 123–130, 2011.
- YE, S. et al. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. **Modern Pathology**, v. 20, p. 375–383, 2007.
- YOULDEN, D. R. et al. The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival

- and mortality. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 3, p. 237–248, 2012.
- ZEESTRATEN, E. C. M. et al. 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. et al. Human leukocyte antigen G is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis. **Immunology Letters**, v. 161, n. 1, p. 13–19, 2014.
- ZIDI, I. et al. Pregnancy and breastfeeding: a new theory for sHLA-G in breast cancer patients? **Immunologic Research**, v. 2, p. 1–4, 2015.

APÊNDICE A - 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 (IC) e de p.

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p
<i>-762 C/T (rs1632946)</i>					
C	109	96	1,264	0,842-1,899	0,278
T	97	108	0,791	0,527-1,188	0,278
Total de Alelos	206	204			
CC	30	18	1,918	0,941-3,928	0,075
TC	49	60	0,635	0,352-1,145	0,140
TT	24	24	0,987	0,492-1,980	1,000
Total de Indivíduos	103	102			
<i>-725 G/C/T (rs1233334)</i>					
C	164	166	0,941	0,564-1,569	0,902
G	22	24	0,907	0,470-1,747	0,876
T	20	16	1,277	0,611-2,680	0,600
Total de Alelos	206	206			
CC	63	65	0,921	0,504-1,681	0,886
GC	18	21	0,827	0,388-1,757	0,722
GG	2	1	2,02	0,141-56,440	1,000
TC	20	15	1,414	0,640-3,135	0,458
TG	0	1	0,330	0,000-9,694	1,000
TT	0	0	-	-	-

Total de Indivíduos	103	103			
Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p
-716 T/G (rs2249863)					
G	92	103	0,807	0,538-1,211	0,324
T	114	103	1,239	0,826-1,860	0,324
Total de Alelos	206	206			
GG	22	21	1,061	0,514-2,189	1,000
TG	48	61	0,601	0,333-1,083	0,094
TT	33	21	1,841	0,934-3,643	0,081
Total de Indivíduos	103	103			
-689 A/G (rs2735022)					
A	126	179	0,108	0,052-0,219	<0,001*
G	72	11	9,299	4,561-19,394	<0,001*
Total de Alelos	198	190			
AA	44	87	0,074	0,029-0,178	<0,001*
GA	38	5	11,213	3,925-34,489	<0,001*
GG	17	3	6,358	1,672-28,366	0,003*
Total de Indivíduos	99	95			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p
-666 G/T (rs35674592)					
G	116	105	1,240	0,826-1,862	0,324
T	90	101	0,807	0,537-1,211	0,324
Total de Alelos	206	206			
GG	36	24	1,769	0,920-3,411	0,091
TG	44	57	0,602	0,334-1,083	0,094
TT	23	22	1,059	0,519-2,158	1,000
Total de Indivíduos	103	103			
-646 A/G (rs17875391)					
A	189	205	0,054	0,003-0,391	<0,001*
G	17	1	18,439	2,559-379,775	<0,001*
Total de Alelos	206	206			
AA	86	102	0,050	0,002-0,365	<0,001*
GA	17	1	20,163	2,740-419,741	<0,001*
GG	0	0	–	–	–
Total de Indivíduos	103	103			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p
-633 G/A (rs1632944)					
A	103	116	0,776	0,517-1,165	0,237
G	103	90	1,289	0,858-1,936	0,237
Total de Alelos	206	206			
AA	26	33	0,716	0,373-1,373	0,355
GA	51	50	1,040	0,580-1,863	1,000
GG	26	20	1,401	0,689-2,858	0,403
Total de Indivíduos	103	103			
-539 A/G (rs112940953)					
A	189	179	1,677	0,847-3,340	0,151
G	17	27	0,596	0,299-1,180	0,151
Total de Alelos	206	206			
AA	91	82	1,942	0,847-4,500	0,128
GA	7	15	0,428	0,150-1,185	0,114
GG	5	6	0,825	0,210-3,183	1,000
Total de Indivíduos	103	103			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	<i>p</i>
-521 C/A (rs138987412)					
A	19	18	1,073	0,519-2,218	0,975
C	185	188	0,932	0,451-1,926	0,975
Total de Alelos	204	206			
AA	3	5	0,594	0,109-2,952	0,729
CA	13	8	1,735	0,634-4,835	0,345
CC	86	90	0,776	0,329-1,826	0,667
Total de Indivíduos	102	103			
-509 C/G (rs17875393)					
C	192	192	-	-	-
G	10	10	-	-	-
Total de Alelos	202	202			
CC	94	94	-	-	-
GC	4	4	-	-	-
GG	3	3	-	-	-
Total de Indivíduos	101	101			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p
-486 A/C (rs1736933)					
A	106	81	1,636	1,086-2,466	0,018*
C	100	125	0,611	0,406-0,921	0,018*
Total de Alelos	206	206			
AA	38	33	1,240	0,670-2,297	0,557
CA	30	15	2,411	1,146-5,116	0,018*
CC	35	55	0,449	0,246-0,819	0,008*
Total de Indivíduos	103	103			
-483 A/G (rs149890776)					
A	184	166	2,015	1,112-3,670	0,019*
G	22	40	0,496	0,272-0,899	0,019*
Total de Alelos	206	206			
AA	87	76	1,932	0,920-4,085	0,086
GA	10	14	0,684	0,265-1,743	0,514
GG	6	13	0,428	0,138-1,276	0,148
Total de Indivíduos	103	103			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p
-477 C/G (rs1736932)					
C	102	97	1,082	0,721-1,624	0,765
G	104	107	0,924	0,616-1,388	0,765
Total de Alelos	206	204			
CC	38	27	1,624	0,859-3,075	0,146
GC	26	43	0,463	0,245-0,874	0,016*
GG	39	32	1,333	0,719-2,475	0,407
Total de Indivíduos	103	102			
-443 G/A (rs17875394)					
A	31	7	5,036	2,055-12,890	<0,001*
G	175	199	0,199	0,078-0,487	<0,001*
Total de Alelos	206	206			
AA	11	2	6,038	1,216-40,525	0,022*
GA	9	3	3,191	0,761-15,391	0,137
GG	83	98	0,212	0,066-0,632	0,003*
Total de Indivíduos	103	103			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	p
-400 G/A (rs17875395)					
A	17	6	2,998	1,084-8,703	0,032*
G	189	200	0,334	0,115-0,923	0,032*
Total de Alelos	206	206			
AA	5	1	5,204	0,576- 121,907	0,214
GA	7	4	1,805	0,455-7,612	0,535
GG	91	98	0,387	0,114-1,245	0,129
Total de Indivíduos	103	103			
-399 G/A (rs17875396)					
A	32	13	2,730	1,330-5,683	0,005*
G	174	193	0,366	0,176-0,752	0,005*
Total de Alelos	206	206			
AA	13	5	2,831	0,893-9,517	0,084
GA	6	3	2,062	0,442-10,735	0,495
GG	84	95	0,372	0,141-0,957	0,039*
Total de Indivíduos	103	103			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	<i>p</i>
-391 G/A (rs17875396)					
A	27	12	2,466	1,157-5,334	0,017*
G	177	194	0,405	0,187-0,864	0,017*
Total de Alelos	204	206			
AA	11	4	2,992	0,840-11,609	0,103
GA	5	4	1,276	0,287-5,855	0,988
GG	86	95	0,453	0,168-1,194	0,122
Total de Indivíduos	102	103			
-369 C/A (rs1632943)					
A	121	117	1,059	0,701-1,598	0,854
C	85	87	0,945	0,626-1,426	0,854
Total de Alelos	206	204			
AA	47	39	1,356	0,748-2,459	0,352
CA	27	39	0,574	0,303-1,083	0,090
CC	29	24	1,274	0,649-2,502	0,550
Total de Indivíduos	103	102			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	<i>p</i>
-355 G/A (rs191630481)					
A	16	16	–	–	–
G	188	188	–	–	–
Total de Alelos	204	204			
AA	7	5	1,429	0,390-5,406	0,766
GA	2	6	0,320	0,044-1,812	0,280
GG	93	91	1,249	0,454-3,464	0,814
Total de Indivíduos	102	102			
-297 G/A (rs781618441)					
A	87	39	3,184	1,993-5,099	<0,001*
G	117	167	0,314	0,196-0,502	<0,001*
Total de Alelos	204	206			
AA	41	18	3,174	1,592-6,372	0,001*
GA	5	3	1,718	0,346-9,365	0,708
GG	56	82	0,312	0,160-0,604	0,001*
Total de Indivíduos	102	103			

Polimorfismo	Caso (n)	Controle (n)	OR	IC	<i>p</i>
-284 G/A					
A	43	38	1,182	0,705-1,982	0,584
G	157	164	0,846	0,505-1,418	0,584
Total de Alelos	200	202			
AA	19	16	1,246	0,565-2,755	0,686
GA	5	6	0,833	0,212-3,219	1,000
GG	76	79	0,882	0,434-1,792	0,837
Total de Indivíduos	100	101			

Fonte: elaborado pela autora 2017.

APÊNDICE B - 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 (IC) e de *p* para OR.

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-762 C/T (rs1632946)					
	C	109	96	1,264	0,842-1,899	0,278
	T	97	108	0,791	0,527-1,188	0,278
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times CC) + (\gamma \times CT)$ versus TT	110	105	1,048	0,535-2,050	1,000
		24	24	0,955	0,488-1,868	1,000
Aditivo	$(2 \times CC + CT) \times \gamma$ versus TT	109	96	1,135	0,578-2,229	0,814
		24	24	0,881	0,449-1,729	0,814
Recessivo Comum	$(CC \times \gamma)$ versus $(CT + TT)$	38	23	1,340	0,998-1,718	0,052*
		73	84	0,526	0,274-1,005	0,052*
Dominante Comum	$(CC + CT) \times \gamma$ versus TT	100	99	1,010	0,514-1,987	1,000
		24	24	0,990	0,503-1,947	1,000

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-725 G/C/T (rs1233334)					
	C	164	166	0,941	0,564-1,569	0,902
	G	22	24	0,907	0,470-1,747	0,876
	T	20	16	1,277	0,611-2,680	0,600
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times TT) + (\gamma \times TG)$ versus GG	0	1	0,200	0,000-18,554	1,000
		2	1	5,000	0,054-6133,012	1,000
	$(\gamma^2 \times TT) + (\gamma \times TC)$ versus CC	25	19	1,358	0,645-2,866	0,487
		63	65	0,737	0,349-1,551	0,487
	$(\gamma^2 \times CC) + (\gamma \times CG)$ versus GG	120	77	0,779	0,028-11,194	1,000
		2	1	1,283	0,089-35,914	1,000
Aditivo	$(2 \times TT + TG) \times \gamma$ versus GG	0	1	0,200	0,000-18,554	1,000
		2	1	5,000	0,054-6133,012	1,000
	$(2 \times TT + TC) \times \gamma$ versus CC	25	19	2,866	1,162-7,226	0,020*
		63	65	0,349	0,138-0,860	0,020*
	$(2 \times CC + CG) \times \gamma$ versus GG	135	142	0,475	0,017-6,752	0,971
		2	1	2,104	0,148-58,493	0,971

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-725 G/C/T (rs1233334)					
	C	164	166	0,941	0,564-1,569	0,902
	G	22	24	0,907	0,470-1,747	0,876
	T	20	16	1,277	0,611-2,680	0,600
Recessivo Comum	(TT x γ) versus (TG + GG)	0	0	-	-	-
		2	2	-	-	-
	(TT x γ) versus (TC + CC)	0	0	0,964	0,001-998,326	1,000
		83	80	1,037	0,001-1074,124	1,000
	(CC x γ) versus (CG + GG)	59	61	1,064	0,497-2,280	1,000
		20	22	0,940	0,439-2,012	1,000
Dominante Comum	(TT + TG) x γ versus GG	0	1	0,200	0,000-18,554	1,000
		2	1	5,000	0,054-6133,012	1,000
	(TT + TC) x γ versus CC	25	19	1,358	0,645-2,866	0,487
		63	65	0,737	0,349-1,551	0,487
	(CC + CG) x γ versus GG	76	81	0,469	0,017-6,785	0,965
		2	1	2,132	0,147-59,892	0,965

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-716 T/G (rs2249863)					
	G	92	103	0,807	0,538-1,211	0,324
	T	114	103	1,239	0,826-1,860	0,324
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times TT) + (\gamma \times GT)$ versus GG	110	107,6	0,981	0,486-1,982	1,000
		22	21	1,019	0,504-2,060	1,000
Aditivo	$(2 \times TT + GT) \times \gamma$ versus GG	141	128	1,051	0,527-2,098	1,000
		22	21	0,951	0,477-1,898	1,000
Recessivo Comum	$(TT \times \gamma)$ versus $(GT + GG)$	41	26	1,847	0,988-3,463	0,055*
		70	82	0,541	0,289-1,012	0,055*
Dominante Comum	$(TT + GT) \times \gamma$ versus GG	100	96	0,994	0,489-2,023	1,000
		22	21	1,006	0,494-2,047	1,000

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-689 A/G (rs2735022)					
	A	126	179	0,108	0,052-0,219	<0,001*
	G	72	11	9,299	4,561-19,394	<0,001*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times GG) + (\gamma \times AG) \text{ versus } AA$	1823	305,5	11,818	7,933-17,640	<0,001*
		44	87	0,085	0,057-0,126	<0,001*
Aditivo	$(2 \times GG + AG) \times \gamma \text{ versus } AA$	669,5	52,5	25,438	15,679-41,413	<0,001*
		44	87	0,039	0,024-0,064	<0,001*
Recessivo Comum	$(GG \times \gamma) \text{ versus } (AG + AA)$	158	28	6,331	3,734-10,785	<0,001*
		82	92	0,158	0,093-0,268	<0,001*
Dominante Comum	$(GG + AG) \times \gamma \text{ versus } AA$	511	74,4	13,654	8,627-21,666	<0,001*
		44	87	0,073	0,046-0,116	<0,001*

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-666 G/T (rs35674592)					
	G	116	105	1,240	0,826-1,862	0,324
	T	90	101	0,807	0,537-1,211	0,324
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times GG) + (\gamma \times GT)$ versus TT	110	108	0,974	0,489-1,941	1,000
		23	22	1,026	0,515-2,045	1,000
Aditivo	$(2 \times GG + GT) \times \gamma$ versus TT	144	119	1,157	0,587-2,281	0,771
		23	22	0,864	0,438-1,703	0,771
Recessivo Comum	$(GG \times \gamma)$ versus $(GT + TT)$	45	30	1,769	0,968-3,239	0,065
		67	79	0,565	0,309-1,033	0,065
Dominante Comum	$(GG + GT) \times \gamma$ versus TT	90	100	0,861	0,428-1,731	0,775
		23	22	1,162	0,578-2,338	0,775

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-646 A/G (rs17875391)					
	A	189	205	0,054	0,003-0,391	0,001*
	G	17	1	18,439	2,559-379,775	0,001*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times GG) + (\gamma \times AG)$ versus AA	313	18	20,624	11,485-37,424	<0,001*
		86	102	0,048	0,027-0,087	<0,001*
Aditivo	$(2 \times GG + AG) \times \gamma$ versus AA	313	18	20,624	11,485-37,424	<0,001*
		86	102	0,048	0,027-0,087	<0,001*
Recessivo Comum	$(GG \times \gamma)$ versus $(AG + AA)$	0	0	-	-	-
		103	103	-	-	-
Dominante Comum	$(GG + AG) \times \gamma$ versus AA	313	18	20,624	11,485-37,424	<0,001*
		86	102	0,048	0,027-0,087	<0,001*

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-633 G/A (rs1632944)					
	A	103	116	0,776	0,517-1,165	0,237
	G	103	90	1,289	0,858-1,936	0,237
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times GG + (\gamma \times AG) \text{ versus } AA)$	109	98	1,412	0,759-2,631	0,310
		26	33	0,708	0,380-1,318	0,310
Aditivo	$(2 \times GG + AG) \times \gamma \text{ versus } AA$	118	104	1,440	0,778-2,671	0,274
		26	33	0,694	0,374-1,286	0,274
Recessivo Comum	$(GG \times \gamma) \text{ versus } (AG + AA)$	33	26	1,368	0,720-2,606	0,383
		77	83	0,731	0,384-1,390	0,383
Dominante Comum	$(GG + AG) \times \gamma \text{ versus } AA$	99	90	1,396	0,745-2,621	0,335
		26	33	0,716	0,382-1,342	0,335

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-539 A/G (rs112940953)					
	A	189	179	1,677	0,847-3,340	0,151
	G	17	27	0,596	0,299-1,180	0,151
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$	268	256	1,256	0,335-4,802	0,945
		5	6	796,000	0,208-2,984	0,945
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	194	190	1,225	0,325-4,712	0,980
		5	6	0,816	0,212-3,079	0,980
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$	153	137	1,954	0,878-4,399	0,109
		12	21	0,512	0,227-1,139	0,109
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	103	107	1,155	0,300-4,523	1,000
		5	6	0,866	0,221-3,330	1,000

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-521 C/A (rs138987412)					
	A	19	18	1,073	0,519-2,218	0,975
	C	185	188	0,932	0,451-1,926	0,975
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AC)$ versus CC	17	14	1,271	0,554-2,925	0,675
		86	90	0,787	0,342-1,804	0,675
Aditivo	$(2 \times AA + AC) \times \gamma$ versus CC	20	19	1,102	0,521-2,331	0,924
		86	90	0,908	0,429-1,919	0,924
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AC + CC)$	3	5	0,594	0,109-2,952	0,729
		99	98	1,684	0,339-9,177	0,729
Dominante Comum	$(AA + AC) \times \gamma$ versus CC	17	14	1,271	0,554-2,925	0,675
		86	90	0,787	0,342-1,804	0,675

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-509 C/G (rs17875393)					
	C	192	192	-	-	-
	G	10	10	-	-	-
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times CC) + (\gamma \times GC) \text{ versus } GG$					
Aditivo	$(2 \times CC + GC) \times \gamma \text{ versus } GG$					
Recessivo Comum	$(CC \times \gamma) \text{ versus } (GC + GG)$					
Dominante Comum	$(CC + GC) \times \gamma \text{ versus } GG$					

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-486 A/C (rs1736933)					
	A	106	81	1,636	1,086-2,466	0,018*
	C	100	125	0,611	0,406-0,921	0,018*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AC)$ versus CC	151	113	2,100	1,252-3,528	0,004*
		35	55	0,476	0,283-0,798	0,004*
Aditivo	$(2 \times AA + AC) \times \gamma$ versus CC	125	90	2,183	1,281-3,726	0,004*
		35	55	0,458	0,268-0,781	0,004*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AC + CC)$	62	54	1,236	0,730-2,097	0,477
		65	70	0,809	0,477-1,371	0,477
Dominante Comum	$(AA + AC) \times \gamma$ versus CC	87	78	1,753	1,006-3,059	0,047*
		35	55	0,571	0,3270,994	0,047*

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-483 A/G (rs149890776)					
	A	184	166	2,015	1,112-3,670	0,019*
	G	22	40	0,496	0,272-0,899	0,019*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	373	337	2,398	0,839-7,157	0,116
		6	13	0,417	0,140-1,191	0,116
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	194	180	2,335	0,806-7,053	0,136
		6	13	0,428	0,142-1,240	0,136
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	175	153	1,930	0,959-3,912	0,067
		16	27	0,618	0,256-1,043	0,067
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma$ versus GG	107	104	2,229	0,753-6,868	0,175
		6	13	0,449	0,146-1,328	0,175

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-477 C/G (rs1736932)					
	C	102	97	1,082	0,721-1,624	0,765
	G	104	107	0,924	0,616-1,388	0,765
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times CC) + (\gamma \times GC)$ versus GG	73	78	0,768	0,419-1,406	0,441
		39	32	1,302	0,711-2,386	0,441
Aditivo	$(2 \times CC + GC) \times \gamma$ versus GG	104	100	0,853	0,479-1,519	0,663
		39	32	1,172	0,658-2,089	0,663
Recessivo Comum	$(CC \times \gamma)$ versus $(GC + GG)$	41	29	1,631	0,878-3,038	0,130
		65	75	0,613	0,329-1,140	0,130
Dominante Comum	$(CC + GC) \times \gamma$ versus GG	66	73	0,742	0,401-1,370	0,382
		39	32	1,348	0,730-2,492	0,382

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-443 G/A (rs17875394)					
	A	31	7	5,036	2,055-12,890	<0,001*
	G	175	199	0,199	0,078-0,487	<0,001*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	324	66	5,796	3,835-8,773	<0,001*
		83	98	0,173	0,114-0,261	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	67	19	4,164	2,231-7,832	<0,001*
		83	98	0,240	0,128-0,448	<0,001*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	55	10	6,038	2,777-13,449	<0,001*
		92	101	0,166	0,074-0,360	<0,001*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma$ versus GG	56	17	3,889	2,018-7,565	<0,001*
		83	98	0,257	0,132-0,495	<0,001*

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-400 G/A (rs17875395)					
	A	17	6	2,998	1,084-8,703	0,032*
	G	189	200	0,334	0,115-0,923	0,032*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	66	9	7,897	3,553-18,084	<0,001*
		91	98	0,127	0,055-0,281	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	31	14	2,385	1,136-5,058	0,019*
		91	98	0,419	0,198-0,880	0,019*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	15	3	5,204	1,357-23,369	0,011*
		98	102	0,192	0,043-0,737	0,011*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma$ versus GG	26	13	2,154	0,990-4,738	0,053*
		91	98	0,464	0,211-1,010	0,053*

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-399 G/A					
	A	32	13	2,730	1,330-5,683	0,005*
	G	174	193	0,366	0,176-0,752	0,005*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	113	45	2,840	1,761-4,589	<0,001*
		84	95	0,352	0,218-0,568	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	42	18	2,639	1,354-5,180	0,004*
		84	95	0,379	0,193-0,739	0,004*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	35	13	2,932	1,390-6,263	0,004*
		90	98	0,341	0,160-0,719	0,004*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma$ versus GG	29	13	2,523	1,169-5,507	0,016*
		84	95	0,396	0,182-0,855	0,016*

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	p
OR alélico	-391 G/A (rs17875396)					
	A	27	12	2,466	1,157-5,334	0,017*
	G	177	194	0,405	0,187-0,864	0,017*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	79	34	2,567	1,518-4,353	<0,001*
		86	95	0,390	0,230-0,659	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	34	18	2,087	1,051-4,169	0,034*
		86	95	0,479	0,240-0,952	0,034*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	27	10	2,937	1,274-6,908	0,009*
		91	99	0,340	0,145-0,785	0,009*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma$ versus GG	23	14	1,815	0,831-3,994	0,149
		86	95	0,551	0,250-1,203	0,149

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-369 C/A (rs1632943)					
	A	121	117	1,059	0,701-1,598	0,854
	C	85	87	0,945	0,626-1,426	0,854
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AC)$ versus CC	81	85	0,789	0,405-1,534	0,553
		29	24	1,268	0,652-2,470	0,553
Aditivo	$(2 \times AA + AC) \times \gamma$ versus CC	123	119	0,855	0,452-1,618	0,717
		29	24	1,169	0,618-2,215	0,717
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AC + CC)$	50	41	1,372	0,765-2,464	0,321
		56	63	0,729	0,406-1,308	0,321
Dominante Comum	$(AA + AC) \times \gamma$ versus CC	76	80	0,786	0,401-1,538	0,551
		29	24	1,272	0,650-2,492	0,551

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-355 G/A (rs191630481)					
	A	16	16	-	-	-
	G	188	188	-	-	-
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$					
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$					
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$					
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$					

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-297 G/A (rs781618441)					
	A	87	39	3,184	1,993-5,099	<0,001*
	G	117	167	0,314	0,196-0,502	<0,001*
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG)$ versus GG	432	192	3,295	2,215-4,905	<0,001*
		56	82	0,304	0,204-0,451	<0,001*
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma$ versus GG	98	45	3,189	1,898-5,369	<0,001*
		56	82	0,314	0,186-0,527	<0,001*
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma)$ versus $(AG + GG)$	130	57	3,178	1,971-5,132	<0,001*
		61	85	0,315	0,195-0,507	<0,001*
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma$ versus GG	57	27	3,091	1,683-5,701	<0,001*
		56	82	0,323	0,175-0,594	<0,001*

Modelo	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	CI	<i>p</i>
OR alélico	-284 G/A					
	A	43	38	1,182	0,705-1,982	0,584
	G	157	164	0,846	0,505-1,418	0,584
Multiplicativo	$(\gamma^2 \times AA) + (\gamma \times AG) \text{ versus } GG$	32	29	1,147	0,608-2,166	0,762
		76	79	0,872	0,462-1,645	0,762
Aditivo	$(2 \times AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	44	39	1,173	0,664-2,072	0,653
		76	79	0,853	0,483-1,506	0,653
Recessivo Comum	$(AA \times \gamma) \text{ versus } (AG + GG)$	22	19	1,215	0,581-2,547	0,701
		81	85	0,823	0,393-1,722	0,701
Dominante Comum	$(AA + AG) \times \gamma \text{ versus } GG$	25	23	1,130	0,563-2,270	0,838
		76	79	0,885	0,440-1,777	0,838

Fonte: elaborado pela autora 2017.

APÊNDICE C - Análises de associação (OR), com seus respectivos valores de CI e *p*, entre os estádios I, II e III em mulheres com câncer de mama para os polimorfismos 5'UUR do gene *HLA-G*.

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-762 C/T (rs1632946)					
C	14	11	1,364	0,407-4,600	0,769
T	14	15	0,733	0,217-2,456	0,769
Total de Alelos	28	26			
CC	4	1	4,800	0,376-131,685	0,369
TC	6	9	0,333	0,049-2,084	0,322
TT	4	3	1,333	0,176-10,470	1,000
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
C	7	11	1,909	0,392-9,598	0,568
T	5	15	0,524	0,104-2,554	0,568
Total de Alelos	12	26			
CC	2	1	6,000	0,285-232,557	0,454
TC	3	9	0,444	0,038-4,713	0,767
TT	1	3	0,667	0,021-11,732	1,000
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-762 C/T (rs1632946)					
C	7	14	1,400	0,294-6,803	0,891
T	5	14	0,714	0,147-3,399	0,891
Total de Alelos	12	28			
CC	2	4	1,250	0,102-14,802	1,000
TC	3	6	1,333	0,135-13,494	1,000
TT	1	4	0,500	0,017-7,868	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-725 G/C/T (rs1233334)					
C	22	17	1,941	0,497-7,754	0,437
G	6	2	3,273	0,507-26,542	0,300
T	0	7	0,000	0,481-0,611	0,011*
Total de Alelos	28	26			
CC	9	4	4,050	0,633-28,760	0,175
GC	4	2	2,200	0,250-22,545	0,718
GG	1	0	3,000	0,088-2204,142	1,000
TC	0	7	0,000	0,481-0,476	0,006*
TG	0	0	0,931	0,001-1022,857	1,000
TT	0	0	0,931	0,001-1022,857	1,000
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-725 G/C/T (rs1233334)					
C	8	17	1,059	0,202-5,709	1,000
G	2	2	2,400	0,201-29,135	0,788
T	2	7	0,543	0,063-3,819	0,779
Total de Alelos	12	26			
CC	3	4	2,250	0,212-26,321	0,767
GC	0	2	0,000	0,684-10,606	0,833
GG	1	0	7,364	0,193-5730,081	0,599
TC	2	7	0,429	0,035-4,568	0,735
TG	0	0	2,077	0,002-2386,445	1,000
TT	0	0	2,077	0,002-2386,445	1,000
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-725 G/C/T (rs1233334)					
C	8	22	0,545	0,096-3,110	0,690
G	2	6	0,733	0,084-5,307	1,000
T	2	0	13,571	0,591-8904,730	0,165
Total de Alelos	12	28			
CC	3	9	0,556	0,052-5,567	0,921
GC	0	4	0,000	0,700-3,843	0,393
GG	1	1	2,600	0,056-124,667	1,000
TC	2	0	16,111	0,572-11512,690	0,163
TG	0	0	2,231	0,002-2556,917	1,000
TT	0	0	2,231	0,002-2556,917	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-716 T/G (rs2249863)					
G	14	14	0,857	0,256-2,858	0,992
T	14	12	1,167	0,350-3,903	0,992
Total de Alelos	28	26			
GG	4	3	1,333	0,176-10,470	1,000
TG	6	8	0,469	0,074-2,808	0,558
TT	4	2	2,200	0,250-22,545	0,718
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p value</i>
G	5	14	0,612	0,123-2,976	0,727
T	7	12	1,633	0,336-8,140	0,727
Total de Alelos	12	26			
GG	1	3	0,667	0,021-11,732	1,000
TG	3	8	0,313	0,035-2,502	0,386
TT	2	2	2,750	0,182-45,863	0,774
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-716 T/G (rs2249863)					
G	5	14	0,714	0,147-3,399	0,891
T	7	14	1,400	0,294-6,803	0,891
Total de Alelos	12	28			
GG	1	4	0,500	0,017-7,868	1,000
TG	3	6	0,667	0,082-5,178	0,985
TT	2	4	1,250	0,102-14,802	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-689 A/G (rs2735022)					
A	15	13	1,154	0,346-3,859	1,000
G	13	13	0,867	0,259-2,890	1,000
Total de Alelos	28	26			
AA	5	2	3,056	0,367-30,333	0,444
GA	5	9	0,247	0,035-1,580	0,175
GG	4	2	2,200	0,250-22,545	0,718
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-689 A/G (rs2735022)					
A	8	13	2,000	0,396-10,608	0,542
G	4	13	0,500	0,094-2,527	0,542
Total de Alelos	12	26			
AA	3	2	0,254	0,029-2,493	0,381
GA	2	9	0,013	0,001-0,104	<0,001*
GG	1	2	0,082	0,003-1,315	0,102
Total de Indivíduos	68	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	8	15	1,733	0,349-8,988	0,675
G	4	13	0,577	0,111-2,864	0,675
Total de Alelos	12	28			
AA	3	5	0,083	0,013-0,499	0,002*
GA	2	5	0,055	0,006-0,393	<0,001*
GG	1	4	0,037	0,001-0,423	0,002*
Total de Indivíduos	68	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-666 G/T (rs35674592)					
G	15	12	1,346	0,404-4,519	0,785
T	13	14	0,743	0,221-2,478	0,785
Total de Alelos	28	26			
GG	5	2	3,056	0,367-30,333	0,444
TG	5	8	0,347	0,053-2,127	0,339
TT	4	3	1,333	0,176-10,470	1,000
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
G	8	12	2,333	0,462-12,415	0,408
T	4	14	0,429	0,081-2,166	0,408
Total de Alelos	12	26			
GG	3	2	5,500	0,418-94,436	0,302
TG	2	8	0,313	0,025-3,363	0,515
TT	1	3	0,667	0,021-11,732	1,000
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-666 G/T (rs35674592)					
G	8	15	1,733	0,349-8,988	0,675
T	4	13	0,577	0,111-2,864	0,675
Total de Alelos	12	28			
GG	3	5	1,800	0,180-19,104	0,921
TG	2	5	0,900	0,076-9,898	1,000
TT	1	4	0,500	0,017-7,868	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-646 A/G (rs17875391)					
A	25	24	0,694	0,073-5,806	1,000
G	3	2	1,440	0,172-13,719	1,000
Total de Alelos	28	26			
AA	11	11	0,667	0,061-6,555	1,000
GA	3	2	1,500	0,153-16,461	1,000
GG	0	0	0,929	0,001-1022,852	1,000
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-646 A/G (rs17875391)					
A	11	24	0,917	0,054-28,425	1,000
G	1	2	1,091	0,035-18,383	1,000
Total de Alelos	12	26			
AA	5	11	0.909	0,042-32,444	1,000
GA	1	2	1,100	0,031-23,531	1,000
GG	0	0	2,077	0,002-2386,445	1,000
Total de Indivíduos	6	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	11	25	1,320	0,100-36,490	1,000
G	1	3	0,758	0,027-10,038	1,000
Total de Alelos	12	28			
AA	5	11	1,364	0,078-43,456	1,000
GA	1	3	0,733	0,023-12,743	1,000
GG	0	0	2,231	0,002-2556,917	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-633 G/A (rs1632944)					
A	14	16	0,625	0,183-2,111	0,562
G	14	10	1,600	0,474-5,464	0,562
Total de Alelos	28	26			
AA	4	3	1,333	0,176-10,470	1,000
GA	6	10	0,225	0,029-1,531	0,159
GG	4	0	11,571	0,585-7165,400	0,164
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
A	6	16	0,625	0,126-3,049	0,752
G	6	10	1,600	0,328-7,929	0,752
Total de Alelos	12	26			
AA	1	3	0,667	0,021-11,732	1,000
GA	4	10	0,600	0,045-7,960	1,000
GG	1	0	7,364	0,193-5730,081	0,599
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-633 G/A (rs1632944)					
A	6	14	-	-	-
G	6	14	-	-	-
Total de Alelos	12	28			
AA	1	4	0,500	0,017-7,868	1,000
GA	4	6	2,667	0,259-31,906	0,625
GG	1	4	0,500	0,017-7,868	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-539 A/G (rs112940953)					
A	26	24	1,083	0,098-11,970	1,000
G	2	2	0,923	0,084-10,192	1,000
Total de Alelos	28	26			
AA	13	11	2,364	0,135-76,093	0,946
GA	0	2	0,000	0,481-3,945	0,430
GG	1	0	3,000	0,088-2204,142	1,000
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-539 A/G (rs112940953)					
A	10	24	0,417	0,034-4,977	0,788
G	2	2	2,400	0,201-29,135	0,788
Total de Alelos	12	26			
AA	4	11	0,364	0,022-5,503	0,774
GA	2	2	2,750	0,182-45,863	0,774
GG	0	0	2,077	0,002-2386,445	1,000
Total de Indivíduos	6	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	10	26	0,385	0,032-4,569	0,730
G	2	2	2,600	0,219-31,409	0,730
Total de Alelos	12	28			
AA	4	13	0,154	0,004-3,219	0,412
GA	2	0	16,111	0,572-11512,690	0,163
GG	0	1	0,000	0,700-46,792	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-521 C/A (rs138987412)					
A	0	4	0,088	0,000-1,503	0,136
C	28	22	11,400	0,665-6747,246	0,136
Total de Alelos	28	26			
AA	0	1	0,000	0,481-16,820	0,970
CA	0	2	0,000	0,481-3,945	0,430
CC	14	10	9667,000	0,458-6114,500	0,250
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
A	1	4	0,611	0,023-7,584	1,000
C	9	22	1,636	0,132-43,506	1,000
Total de Alelos	10	26			
AA	0	1	0,000	0,722-54,146	1,000
CA	1	2	1,375	0,037-32,248	1,000
CC	4	10	1,200	0,062-40,140	1,000
Total de Indivíduos	5	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-521 C/A (rs138987412)					
A	1	0	9,000	0,268-6594,951	0,465
C	9	28	0,111	0,000-3,729	0,465
Total de Alelos	10	28			
AA	0	0	2,636	0,002-3068,201	1,000
CA	1	0	9,667	0,246-7673,877	0,481
CC	4	14	0,103	0,000-4,059	0,481
Total de Indivíduos	5	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-509 C/G (rs17875393)					
C	26	25	3,118	0,099-2210,594	1,000
G	0	1	0,321	0,000-10,070	1,000
Total de Alelos	26	26			
CC	13	12	3,240	0,094-2387,806	1,000
GC	0	1	0,309	0,000-10,625	1,000
GG	0	0	-	-	-
Total de Indivíduos	13	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-509 C/G (rs17875393)					
C	12	25	1,471	0,044-1064,318	1,000
G	0	1	0,680	0,001-22,473	1,000
Total de Alelos	12	26			
CC	6	12	1,560	0,041-1193,820	1,000
GC	0	1	0,641	0,001-24,516	1,000
GG	0	0	2,077	0,002-2386,445	1,000
Total de Indivíduos	6	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>P</i>
C	12	26	0,472	0,000-511,442	1,000
G	0	0	2,120	0,002-2301,479	1,000
Total de Alelos	12	26			
CC	6	13	0,481	0,000-550,728	1,000
GC	0	0	2,077	0,002-2386,445	1,000
GG	0	0	2,077	0,002-2386,445	1,000
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-486 A/C (rs1736933)					
A	14	11	1,364	0,407-4,600	0,769
C	14	15	0,733	0,217-2,456	0,769
Total de Alelos	28	26			
AA	5	3	1,852	0,261-13,982	0,767
CA	4	5	0,640	0,095-4,189	0,892
CC	5	5	0,889	0,141-5,567	1,000
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
A	8	11	2,727	0,537-14,639	0,296
C	4	15	0,367	0,068-1,861	0,296
Total de Alelos	12	26			
AA	3	3	3,333	0,293-44,988	0,520
CA	2	5	0,800	0,066-8,974	1,000
CC	1	5	0,320	0,011-4,830	0,675
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-486 A/C (rs1736933)					
A	8	14	2,000	0,404-10,382	0,532
C	4	14	0,500	0,096-2,474	0,532
Total de Alelos	12	28			
AA	3	5	1,800	0,180-19,104	0,921
CA	2	4	1,250	0,102-14,802	1,000
CC	1	5	0,360	0,012-5,328	0,749
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-483 A/G (rs149890776)					
A	26	23	1,696	0,203-16,173	0,931
G	2	3	0,590	0,062-4,928	0,931
Total de Alelos	28	26			
AA	13	11	2,364	0,135-76,093	0,946
GA	0	1	0,287	0,00-9,820	0,960
GG	1	1	0,923	0,022-38,920	1,000
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-483 A/G (rs149890776)					
A	10	23	0,652	0,070-6,727	1,000
G	2	3	1,533	0,149-14,311	1,000
Total de Alelos	12	26			
AA	4	11	0,364	0,022-5,503	0,774
GA	2	1	6,000	0,285-232,557	0,454
GG	0	1	0,000	0,684-43,436	1,000
Total de Indivíduos	6	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	10	26	0,385	0,032-4,569	0,730
G	2	2	2,600	0,219-31,409	0,730
Total de Alelos	12	28			
AA	4	13	0,154	0,004-3,219	0,412
GA	2	0	16,111	0,572-11512,6	0,163
GG	0	1	0,000	0,700-46,792	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
<i>-477 C/G (rs1736932)</i>					
C	16	10	2,133	0,629-7,362	0,272
G	12	16	0,469	0,136-1,589	0,272
Total de Alelos	28	26			
CC	7	2	5,500	0,689-53,863	0,134
GC	2	6	0,194	0,019-1,588	0,165
GG	5	5	0,889	0,141-5,567	1,000
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
C	5	10	1,143	0,228-5,690	1,000
G	7	16	0,875	0,176-4,379	1,000
Total de Alelos	12	26			
CC	2	2	2,750	0,182-45,863	0,774
GC	1	6	0,233	0,008-3,416	0,467
GG	3	5	1,600	0,156-17,287	1,000
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-477 C/G (rs1736932)					
C	5	16	0,536	0,109-2,556	0,580
G	7	12	1,867	0,391-9,165	0,580
Total de Alelos	12	28			
CC	2	7	0,500	0,043-5,163	0,845
GC	1	2	1,200	0,034-25,400	1,000
GG	3	5	1,800	0,180-19,104	0,921
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-443 G/A (rs17875394)					
A	4	4	0,917	0,167-5,113	1,000
G	24	22	1,091	0,196-6,087	1,000
Total de Alelos	28	26			
AA	2	2	0,917	0,073-11,517	1,000
GA	0	0	0,931	0,001-1022,85	1,000
GG	12	11	1,091	0,087-13,754	1,000
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-443 G/A (rs17875394)					
A	1	4	0,500	0,019-5,975	0,935
G	11	22	2,000	0,167-52,254	0,935
Total de Alelos	12	26			
AA	0	2	0,354	0,001-9,777	1,000
GA	1	0	7,364	0,193-5730,08	0,599
GG	5	11	0,909	0,042-32,444	1,000
Total de Indivíduos	6	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	1	4	0,545	0,021-6,478	1,000
G	11	24	1,833	0,154-47,721	1,000
Total de Alelos	12	28			
AA	0	2	0,000	0,700-11,450	0,871
GA	1	0	7,909	0,208-6139,4	0,562
GG	5	12	0,833	0,039-29,509	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-400 G/A (rs17875395)					
A	2	2	0,923	0,084-10,192	1,000
G	26	24	1,083	0,098-11,970	1,000
Total de Alelos	28	26			
AA	1	0	3,000	0,088-2204,1	1,000
GA	0	2	0,159	0,000-3,796	0,501
GG	13	11	2,364	0,135-76,093	0,946
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
A	1	2	1,091	0,035-18,383	1,000
G	11	24	0,917	0,054-28,425	1,000
Total de Alelos	12	26			
AA	0	0	2,077	0,002-2386,4	1,000
GA	1	2	1,100	0,031-23,531	1,000
GG	5	11	0,909	0,042-32,444	1,000
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-400 G/A (rs17875395)					
A	1	2	1,182	0,038-19,819	1,000
G	11	26	0,846	0,050-26,156	1,000
Total de Alelos	12	28			
AA	0	1	0,692	0,001-26,292	1,000
GA	1	0	7,909	0,208-6139,4	0,562
GG	5	13	0,385	0,008-17,876	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-399 G/A (rs17875396)					
A	2	8	0,173	0,022-1,054	0,059♦
G	26	18	5,778	0,949-44,932	0,059♦
Total de Alelos	28	26			
AA	1	3	0,256	0,009-3,615	0,533
GA	0	2	0,159	0,000-3,796	0,501
GG	13	8	8,125	0,663-218,8	0,135
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-399 G/A (rs17875396)					
A	6	8	2,250	0,449-11,623	0,435
G	6	18	0,444	0,086-2,228	0,435
Total de Alelos	12	26			
AA	3	3	3,333	0,293-44,988	0,520
GA	0	2	0,354	0,001-9,777	1,000
GG	3	8	0,625	0,058-6,416	1,000
Total de Indivíduos	6	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	6	2	13,000	1,671-127,248	0,008*
G	6	26	0,077	0,008-0,599	0,008*
Total de Alelos	12	28			
AA	3	1	13,000	0,702-498,93	0,112
GA	0	0	2,231	0,002-2556,91	1,000
GG	3	13	0,077	0,002-1,424	0,112
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-391 G/A (rs17875396)					
A	2	4	0,423	0,048-3,101	0,596
G	26	22	2,364	0,322-20,874	0,596
Total de Alelos	28	26			
AA	1	2	0,423	0,013-7,417	0,946
GA	0	0	0,931	0,001-1022,8	1,000
GG	13	11	2,364	0,135-76,093	0,946
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
A	4	4	3,667	0,540-26,464	0,253
G	6	22	0,273	0,038-1,851	0,253
Total de Alelos	10	26			
AA	2	2	3,667	0,223-72,337	0,622
GA	0	0	2,455	0,002-2863,6	1,000
GG	3	11	0,273	0,014-4,494	0,622
Total de Indivíduos	5	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-391 G/A (rs17875396)					
A	4	2	8,667	0,986-92,738	0,052*
G	6	26	0,115	0,011-1,014	0,052*
Total de Alelos	10	28			
AA	2	1	8,667	0,383-372,505	0,310
GA	0	0	2,636	0,002-3068,20	1,000
GG	3	13	0,115	0,003-2,611	0,310
Total de Indivíduos	5	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-369 C/A (rs1632943)					
A	15	19	0,425	0,115-1,528	0,230
C	13	7	2,352	0,655-8,664	0,230
Total de Alelos	28	26			
AA	5	7	0,476	0,075-2,873	0,575
CA	5	5	0,889	0,141-5,567	1,000
CC	4	1	4,800	0,376-131,6	0,369
Total de Indivíduos	14	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-369 C/A (rs1632943)					
A	10	19	1,842	0,262-15,794	0,779
C	2	7	0,543	0,063-3,819	0,779
Total de Alelos	12	26			
AA	4	7	1,714	0,159-20,577	0,979
CA	2	5	0,800	0,066-8,974	1,000
CC	0	1	0,641	0,001-24,516	1,000
Total de Indivíduos	6	13			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	10	15	4,333	0,676-34,983	0,154
C	2	13	0,231	0,029-1,480	0,154
Total de Alelos	12	28			
AA	4	5	3,600	0,343-44,796	0,433
CA	2	5	0,900	0,076-9,898	1,000
CC	0	4	0,179	0,000-4,061	0,518
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-355 G/A (rs191630481)					
A	2	0	5,000	0,235-3188,8	0,596
G	26	26	0,200	0,000-4,263	0,596
Total de Alelos	28	26			
AA	1	0	3,000	0,088-2204,1	1,000
GA	0	0	0,931	0,001-1022,8	1,000
GG	13	13	0,333	0,000-11,395	1,000
Total de Indivíduos	14	13			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
A	1	0	6,913	0,210-5023,8	0,587
G	11	26	0,145	0,000-4,770	0,587
Total de Alelos	12	26			
AA	0	0	2,077	0,002-2386,4	1,000
GA	1	0	7,364	0,193-5730,08	0,599
GG	5	13	0,136	0,000-5,193	0,599
Total de Indivíduos	6	13			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-355 G/A (rs191630481)					
A	1	2	1,182	0,038-19,819	1,000
G	11	26	0,846	0,050-26,156	1,000
Total de Alelos	12	28			
AA	0	1	0,692	0,001-26,292	1,000
GA	1	0	7,909	0,208-6139,4	0,562
GG	5	13	0,385	0,008-17,876	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-297 G/A (rs781618441)					
A	12	6	2,250	0,593-8,792	0,291
G	16	18	0,444	0,114-1,687	0,291
Total de Alelos	28	24			
AA	6	3	2,250	0,321-16,966	0,588
GA	0	0	0,862	0,001-949,79	1,000
GG	8	9	0,444	0,059-3,117	0,588
Total de Indivíduos	14	12			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-297 G/A (rs781618441)					
A	4	6	1,500	0,258-8,713	0,896
G	8	18	0,667	0,115-3,878	0,896
Total de Alelos	12	24			
AA	2	3	1,500	0,111-20,536	1,000
GA	0	0	1,923	0,002-2215,9	1,000
GG	4	9	0,667	0,049-0,038	1,000
Total de Indivíduos	6	12			
	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
A	4	12	0,667	0,128-3,329	0,833
G	8	16	1,500	0,300-7,799	0,833
Total de Alelos	12	28			
AA	2	6	0,667	0,057-7,023	1,000
GA	0	0	2,231	0,002-2556,9	1,000
GG	4	8	1,500	0,142-17,459	1,000
Total de Indivíduos	6	14			

Polimorfismo	Estádio-II	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
-284 G/A					
A	0	2	0,158	0,000-3,387	0,466
G	28	22	6,333	0,295-4047,8	0,466
Total de Alelos	28	24			
AA	0	1	0,264	0,000-9,109	0,917
GA	0	0	0,862	0,001-949,79	1,000
GG	14	11	3,783	0,110-2790,9	0,917
Total de Indivíduos	14	12			
	Estádio-III	Estádio-I	OR	IC	<i>p</i>
A	2	2	2,750	0,222-34,857	0,705
G	8	22	0,364	0,029-4,498	0,705
Total de Alelos	10	24			
AA	1	1	2,750	0,056-141,75	1,000
GA	0	0	2,273	0,002-2659,0	1,000
GG	4	11	0,364	0,007-17,828	1,000
Total de Indivíduos	5	12			

Polimorfismo	Estádio-III	Estádio-II	OR	IC	<i>p</i>
-284 G/A					
A	2	0	16,765	0,710-11130,6	0,114
G	8	28	0,060	0,000-1,408	0,114
Total de Alelos	10	28			
AA	1	0	9,667	0,246-7673-87	0,481
GA	0	0	2,636	0,002-3068,20	1,000
GG	4	14	0,103	0,000-4,059	0,481
Total de Indivíduos	5	14			

Fonte: elaborado pela autora 2017.

APÊNDICE D - Análises de associação de risco (OR) entre os 3 tipos de Grau de Elston-Ellis (Grau I, Grau II e Grau III), e seus valores de IC e *p*, em mulheres com câncer de mama.

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
<i>-762 C/T (rs1632946)</i>					
C	35	10	1,581	0,558-4,520	0,474
T	31	14	0,633	0,221-1,793	0,474
Total de Alelos	66	24			
CC	8	4	0,640	0,123-3,394	0,819
TC	19	2	6,786	1,099-53,623	0,036*
TT	6	6	0,222	0,041-1,145	0,079
Total de Indivíduos	33	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
C	26	10	1,517	0,510-4,554	0,559
T	24	14	0,659	0,220-1,963	0,559
Total de Alelos	50	24			
CC	7	4	0,778	0,140-4,373	1,000
TC	12	2	4,615	0,699-38,106	0,139
TT	6	6	0,316	0,056-1,681	0,228
Total de Indivíduos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
<i>-762 C/T (rs1632946)</i>					
C	26	35	0,960	0,430-2,140	1,000
T	24	31	1,042	0,467-2,324	1,000
Total de Alelos	50	66			
CC	7	8	1,215	0,319-4,618	0,984
TC	12	19	0,680	0,209-2,195	0,646
TT	6	6	1,421	0,336-6,048	0,830
Total de Indivíduos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
C	26	45	1,083	0,512-2,293	0,960
T	24	45	0,923	0,436-1,953	0,960
Total de Alelos	50	90			
CC	7	12	1,069	0,311-3,629	1,000
TC	12	21	1,055	0,354-3,143	1,000
TT	6	12	0,868	0,241-3,056	1,000
Total de Indivíduos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
<i>-762 C/T (rs1632946)</i>					
C	61	10	1,553	0,588-4,140	0,453
T	55	14	0,644	0,242-1,701	0,453
Total de Alelos	116	24			
CC	15	4	0,698	0,156-3,255	0,863
TC	31	2	5,741	1,031-41,812	0,045*
TT	12	6	0,261	0,059-1,132	0,079
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
<i>-725 G/C/T (rs1233334)</i>					
C	49	18	0,961	0,285-3,145	1,000
G	8	4	0,690	0,162-3,090	0,834
T	9	2	1,737	0,309-12,680	0,752
Total de Alelos	66	24			
CC	16	7	0,672	0,144-3,063	0,805
GC	8	2	1,600	0,240-13,174	0,893
GG	0	1	0,000	0,267-6,321	0,593
TC	9	2	1,875	0,287-15,191	0,734
TG	0	0	0,373	0,000-402,958	1,000
TT	0	0	0,373	0,000-402,958	1,000
Total de Indivíduos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-725 G/C/T (rs1233334)					
C	40	18	1,333	0,361-4,847	0,852
G	6	4	0,682	0,146-3,291	0,852
T	4	2	0,957	0,134-8,243	1,000
Total de Alelos	50	24			
CC	16	7	1,270	0,249-6,471	1,000
GC	4	2	0,952	0,115-9,133	1,000
GG	1	1	0,458	0,011-18,777	1,000
TC	4	2	0,952	0,115-9,133	1,000
TG	0	0	0,490	0,000-531,899	1,000
TT	0	0	0,490	0,000-531,899	1,000
Total de Indivíduos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
<i>-725 G/C/T (rs1233334)</i>					
C	40	49	1,388	0,527-3,695	0,613
G	6	8	0,989	0,279-3,446	1,000
T	4	9	0,551	0,132-2,135	0,512
Total de Alelos	50	66			
CC	16	16	1,889	0,574-6,306	0,363
GC	4	8	0,595	0,127-2,636	0,659
GG	1	0	4,102	0,132-2899	0,847
TC	4	9	0,508	0,111-2,197	0,483
TG	0	0	1,314	0,001-1391	1,000
TT	0	0	1,314	0,001-1391	1,000
Total de Indivíduos	25	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-725 G/C/T (rs1233334)					
C	40	67	1,373	0,552-3,464	0,593
G	6	12	0,886	0,273-2,782	1,000
T	4	11	0,625	0,157-2,296	0,625
Total de Alelos	50	90			
CC	16	23	1,700	0,558-5,251	0,430
GC	4	10	0,667	0,152-2,746	0,755
GG	1	1	1,833	0,048-70,648	1,000
TC	4	11	0,589	0,136-2,385	0,602
TG	0	0	1,784	0,002-1882	1,000
TT	0	0	1,784	0,002-1882	1,000
Total de Indivíduos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-725 G/C/T (rs1233334)					
C	89	18	1,099	0,349-3,334	1,000
G	14	4	0,686	0,183-2,769	0,781
T	13	2	1,388	0,267-9,583	0,959
Total de Alelos	116	24			
CC	32	7	0,879	0,210-3,600	1,000
GC	12	2	1,304	0,218-9,932	1,000
GG	1	1	0,193	0,005-7,723	0,765
TC	13	2	1,444	0,244-10,906	0,956
TG	0	0	0,214	0,000-229,272	1,000
TT	0	0	0,214	0,000-229,272	1,000
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-716 T/G (rs2249863)					
G	30	14	0,595	0,208-1,687	0,400
T	36	10	1,680	0,593-4,808	0,400
Total de Alelos	66	24			
GG	6	5	0,311	0,057-1,641	0,219
TG	18	4	2,400	0,506-12,007	0,357
TT	9	3	1,125	0,204-6,718	1,000
Total de Individuos	33	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
G	21	14	0,517	0,171-1,545	0,286
T	29	10	1,933	0,647-5,843	0,286
Total de Alelos	50	24			
GG	5	5	0,350	0,059-1,989	0,321
TG	11	4	1,571	0,305-8,421	0,794
TT	9	3	1,688	0,294-10,468	0,769
Total de Individuos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-716 T/G (rs2249863)					
G	21	30	0,869	0,387-1,949	0,856
T	29	36	1,151	0,513-2,585	0,856
Total de Alelos	50	66			
GG	5	6	1,125	0,250-5,013	1,000
TG	11	18	0,655	0,201-2,113	0,595
TT	9	9	1,500	0,425-5,323	0,670
Total de Individuos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
G	21	44	0,757	0,355-1,610	0,544
T	29	46	1,321	0,621-2,817	0,544
Total de Alelos	50	90			
GG	5	11	0,773	0,198-2,905	0,899
TG	11	22	0,821	0,274-2,452	0,887
TT	9	12	1,547	0,477-5,019	0,586
Total de Individuos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-716 T/G (rs2249863)					
G	51	14	0,560	0,210-1,482	0,290
T	65	10	1,784	0,675-4,764	0,290
Total de Alelos	116	24			
GG	11	5	0,328	0,073-1,480	0,185
TG	29	4	2,000	0,470-9,021	0,462
TT	18	3	1,350	0,282-7,191	0,945
Total de Individuos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-689 A/G (rs2735022)					
A	40	12	1,389	0,467-4,125	0,685
G	24	10	0,720	0,242-2,140	0,685
Total de Alelos	64	22			
AA	12	5	0,720	0,147-3,539	0,914
GA	16	2	4,500	0,712-35,848	0,136
GG	4	4	0,250	0,037-1,610	0,192
Total de Individuos	32	11			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-689 A/G (rs2735022)					
A	30	12	1,389	0,443-4,361	0,713
G	18	10	0,720	0,229-2,258	0,713
Total de Alelos	48	22			
AA	10	5	0,857	0,162-4,5534	1,000
GA	10	2	3,214	0,467-27,318	0,330
GG	4	4	0,350	0,051-2,314	0,393
Total de Indivíduos	24	11			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	30	40	0,997	0,433-2,301	1,000
G	18	24	1,003	0,435-2,310	1,000
Total de Alelos	48	64			
AA	10	12	1,190	0,352-4,035	0,969
GA	10	16	0,714	0,214-2,368	0,728
GG	4	4	1,400	0,252-7,807	0,956
Total de Indivíduos	24	32			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-689 A/G (rs2735022)					
A	30	52	1,090	0,495-2,405	0,963
G	18	34	0,918	0,416-2,019	0,963
Total de Alelos	48	86			
AA	10	17	1,092	0,350-3,400	1,000
GA	10	18	0,992	0,319-3,073	1,000
GG	4	8	0,875	0,191-3,808	1,000
Total de Indivíduos	24	43			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	70	12	1,389	0,502-3,824	0,645
G	42	10	0,720	0,262-1,991	0,645
Total de Alelos	112	22			
AA	22	5	0,776	0,179-3,409	0,964
GA	26	2	3,900	0,683-28,942	0,161
GG	8	4	0,292	0,056-1,531	0,188
Total de Indivíduos	56	11			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-666 G/T (rs35674592)					
G	38	11	1,604	0,568-4,555	0,453
T	28	13	0,623	0,220-1,760	0,453
Total de Alelos	66	24			
GG	11	4	0,965	0,210-4,557	1,000
TG	16	3	2,824	0,545-16,189	0,285
TT	6	5	0,311	0,057-1,641	0,219
Total de Indivíduos	33	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
G	28	11	1,504	0,508-4,486	0,567
T	22	13	0,665	0,223-1,970	0,567
Total de Alelos	50	24			
GG	9	4	1,125	0,213-6,111	1,000
TG	10	3	2,000	0,353-12,320	0,598
TT	6	5	0,442	0,079-2,406	0,474
Total de Indivíduos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-666 G/T (rs35674592)					
G	28	38	0,938	0,418-2,105	1,000
T	22	28	1,066	0,475-2,393	1,000
Total de Alelos	50	66			
GG	9	11	1,125	0,329-3,843	1,000
TG	10	16	0,708	0,216-2,303	0,706
TT	6	6	1,421	0,336-6,048	0,830
Total de Indivíduos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
G	28	49	1,065	0,501-2,265	1,000
T	22	41	0,939	0,441-1,995	1,000
Total de Alelos	50	90			
GG	9	15	1,125	0,357-3,531	1,000
TG	10	19	0,912	0,300-2,762	1,000
TT	6	11	0,976	0,268-3,487	1,000
Total de Indivíduos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-666 G/T (rs35674592)					
G	66	11	1,560	0,594-4,120	0,444
T	50	13	0,641	0,243-1,684	0,444
Total de Alelos	116	24			
GG	20	4	1,053	0,243-4,803	1,000
TG	26	3	2,438	0,522-12,788	0,344
TT	12	5	0,365	0,082-1,628	0,241
Total de Individuos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-646 A/G (rs17875391)					
A	60	22	0,909	0,116-5,602	1,000
G	6	2	1,100	0,178-8,588	1,000
Total de Alelos	66	24			
AA	27	10	0,900	0,105-6,414	1,000
GA	6	2	1,111	0,156-9,560	1,000
GG	0	0	0,373	0,000-402,958	1,000
Total de Individuos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-646 A/G (rs17875391)					
A	47	22	1,424	0,153-11,648	1,000
G	3	2	0,702	0,086-6,553	1,000
Total de Alelos	50	24			
AA	22	10	1,467	0,142-13,741	1,000
GA	3	2	0,682	0,073-7,058	1,000
GG	0	0	0,490	0,000-531,899	1,000
Total de Individuos	25	12			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	47	60	1,567	0,324-8,422	0,790
G	3	6	0,638	0,119-3,090	0,790
Total de Alelos	50	66			
AA	22	27	1,630	0,307-9,447	0,781
GA	3	6	0,614	0,106-3,253	0,781
GG	0	0	1,314	0,001-1391	1,000
Total de Individuos	25	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-646 A/G (rs17875391)					
A	47	82	1,528	0,345-7,684	0,779
G	3	8	0,654	0,130-2,900	0,779
Total de Alelos	50	90			
AA	22	37	1,586	0,329-8,522	0,769
GA	3	8	0,631	0,117-3,040	0,769
GG	0	0	1,784	0,002-1882	1,000
Total de Individuos	25	45			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	107	22	1,081	0,150-5,972	1,000
G	9	2	0,925	0,167-6,663	1,000
Total de Alelos	116	24			
AA	49	10	1,089	0,139-6,845	1,000
GA	9	2	0,918	0,146-7,215	1,000
GG	0	0	0,214	0,000-229,272	1,000
Total de Individuos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-633 G/A (rs1632944)					
A	34	15	0,638	0,219-1,829	0,493
G	32	9	1,569	0,547-4,558	0,493
Total de Alelos	66	24			
AA	7	6	0,269	0,052-2,340	0,130
GA	20	3	4,615	0,885-26,877	0,075
GG	6	3	0,667	0,110-4,264	0,933
Total de Indivíduos	33	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	25	15	0,600	0,197-1,807	0,447
G	25	9	1,667	0,553-5,084	0,447
Total de Alelos	50	24			
AA	6	6	0,316	0,056-1,681	0,228
GA	13	3	3,250	0,584-19,956	0,232
GG	6	3	0,947	0,152-6,235	1,000
Total de Indivíduos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-633 G/A (rs1632944)					
A	25	34	0,941	0,422-2,096	1,000
G	25	32	1,063	0,477-2,368	1,000
Total de Alelos	50	66			
AA	6	7	1,173	0,287-4,770	1,000
GA	13	20	1,788	0,615-5,226	0,345
GG	6	6	1,421	0,336-6,048	0,830
Total de Individuos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	25	49	0,837	0,395-1,772	0,743
G	25	41	1,195	0,564-2,532	0,743
Total de Alelos	50	90			
AA	6	13	0,777	0,218-2,703	0,873
GA	13	23	1,036	0,348-3,087	1,000
GG	6	9	1,263	0,335-4,699	0,931
Total de Individuos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-633 G/A (rs1632944)					
A	59	15	0,621	0,229-1,662	0,415
G	57	9	1,610	0,602-4,371	0,415
Total de Alelos	116	24			
AA	13	6	0,289	0,066-1,240	0,109
GA	33	3	3,960	0,849-20,820	0,090
GG	12	3	0,783	0,155-4,325	1,000
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-539 A/G (rs112940953)					
A	57	21	0,905	0,174-4,188	1,000
G	9	3	1,105	0,239-5,745	1,000
Total de Alelos	66	24			
AA	27	10	0,900	0,105-6,414	1,000
GA	3	1	1,100	0,084-30,210	1,000
GG	3	1	1,100	0,084-30,210	1,000
Total de Indivíduos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-539 A/G (rs112940953)					
A	48	21	3,429	0,420-32,239	0,385
G	2	3	0,292	0,031-2,381	0,385
Total de Alelos	50	24			
AA	23	10	2,300	0,192-27,998	0,819
GA	2	1	0,957	0,057-29,714	1,000
GG	0	1	0,000	0,324-8,424	0,703
Total de Indivíduos	25	12			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	48	57	3,789	0,710-26,779	0,151
G	2	9	0,264	0,037-1,408	0,151
Total de Alelos	50	66			
AA	23	27	2,556	0,401-20,479	0,466
GA	2	3	0,870	0,092-7,221	1,000
GG	0	3	0,000	0,569-2,985	0,343
Total de Indivíduos	25	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-539 A/G (rs112940953)					
A	48	78	3,692	0,734-25,028	0,141
G	2	12	0,271	0,040-1,363	0,141
Total de Alelos	50	90			
AA	23	37	2,486	0,426-18,640	0,445
GA	2	4	0,891	0,103-6,360	1,000
GG	0	4	0,000	0,643-2,775	0,319
Total de Individuos	25	45			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	105	21	1,364	0,275-5,967	0,941
G	11	3	0,733	0,168-3,640	0,941
Total de Alelos	116	24			
AA	50	10	1,250	0,156-8,048	1,000
GA	5	1	1,038	0,097-25,408	1,000
GG	3	1	0,600	0,047-16,238	1,000
Total de Individuos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-521 C/A (rs138987412)					
A	7	2	1,186	0,198-9,045	1,000
C	59	20	0,843	0,111-5,039	1,000
Total de Alelos	66	22			
AA	2	0	1,825	0,080-1188.6	1,000
CA	3	2	0,450	0,048-4,632	0,784
CC	28	9	1244,000	0,138-9,547	1,000
Total de Indivíduos	33	11			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	4	2	0,870	0,121-7,502	1,000
C	46	20	1,150	0,133-8,275	1,000
Total de Alelos	50	22			
AA	0	0	0,451	0,000-490,981	1,000
CA	4	2	0,857	0,101-8,298	1,000
CC	21	9	1,167	0,121-9,864	1,000
Total de Indivíduos	25	11			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-521 C/A (rs138987412)					
A	4	7	0,733	0,168-3,027	0,878
C	46	59	1,364	0,330-5,962	0,878
Total de Alelos	50	66			
AA	0	2	0,000	0,569-5,548	0,598
CA	4	3	1,905	0,312-12,258	0,694
CC	21	28	0,938	0,185-4,852	1,000
Total de Indivíduos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	4	9	0,763	0,185-2,927	0,899
C	46	79	1,310	0,342-5,396	0,899
Total de Alelos	50	88			
AA	0	2	0,000	0,638-7,421	0,737
CA	4	5	1,486	0,293-7,382	0,859
CC	21	37	0,993	0,222-4,642	1,000
Total de Indivíduos	25	44			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-521 C/A (rs138987412)					
A	11	2	1,048	0,195-7,428	1,000
C	105	20	0,955	0,135-5,138	1,000
Total de Alelos	116	22			
AA	2	0	1,018	0,045-658,0	1,000
CA	7	2	0,618	0,091-5,108	0,950
CC	49	9	1,210	0,152-7,764	1,000
Total de Indivíduos	58	11			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-509 C/G (rs17875393)					
C	59	0	833,000	44,865-511805,064	<0,001*
G	3	24	0,001	0,000-0,022	<0,001*
Total de Alelos	62	24			
CC	29	0	295,000	13,000-199561,059	<0,001*
GC	1	0	1,230	0,038-886,9	1,000
GG	1	12	0,002	0,000-0,057	<0,001*
Total de Indivíduos	31	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	p
-509 C/G (rs17875393)					
C	47	0	665,000	35,603-409442,385	<0,001*
G	3	24	0,002	0,000-0,028	<0,001*
Total de Alelos	50	24			
CC	23	0	235,000	10,229-159647,548	<0,001*
GC	1	0	1,531	0,046-1108,6	1,000
GG	1	12	0,002	0,000-0,072	<0,001*
Total de Indivíduos	25	12			
	G-III	G-II	OR	IC	p
C	47	59	0,797	0,121-5,246	1,000
G	3	3	1,255	0,191-8,257	1,000
Total de Alelos	50	62			
CC	23	29	0,793	0,072-8,721	1,000
GC	1	1	1,250	0,032-48,642	1,000
GG	1	1	1,250	0,032-48,642	1,000
Total de Indivíduos	25	31			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-509 C/G (rs17875393)					
C	47	59	7,169	1,906-31,717	0,002*
G	3	27	0,139	0,032-0,525	0,002*
Total de Alelos	50	86			
CC	23	29	5,552	1,030-39,535	0,045*
GC	1	1	1,750	0,045-67,504	1,000
GG	1	13	0,096	0,004-0,802	0,023*
Total de Individuos	25	43			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
C	106	0	802,846	52,026-456437,044	<0,001*
G	6	24	0,001	0,000-0,019	<0,001*
Total de Alelos	112	24			
CC	52	0	291,667	16,127-176324,452	<0,001*
GC	2	0	1,147	0,052-739,246	1,000
GG	2	12	0,002	0,000-0,041	<0,001*
Total de Individuos	56	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-486 A/C (rs1736933)					
A	34	10	1,488	0,525-4,251	0,556
C	32	14	0,672	0,235-1,905	0,556
Total de Alelos	66	24			
AA	12	4	1,143	0,235-5,767	1,000
CA	10	2	2,174	0,339-17,499	0,593
CC	11	6	0,500	0,106-2,316	0,501
Total de Indivíduos	33	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	28	10	1,782	0,598-5,369	0,365
C	22	14	0,561	0,186-1,674	0,365
Total de Alelos	50	24			
AA	9	4	1,125	0,213-6,111	1,000
CA	10	2	3,333	0,498-27,650	0,297
CC	6	6	0,316	0,056-1,681	0,228
Total de Indivíduos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-486 A/C (rs1736933)					
A	28	34	1,198	0,536-2,680	0,770
C	22	32	0,835	0,373-1,865	0,770
Total de Alelos	50	66			
AA	9	12	0,984	0,291-3,321	1,000
CA	10	10	1,533	0,450-5,264	0,623
CC	6	11	0,632	0,167-2,336	0,629
Total de Individuos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	28	44	1,331	0,627-2,829	0,528
C	22	46	0,752	0,354-1,594	0,528
Total de Alelos	50	90			
AA	9	16	1,020	0,325-3,176	1,000
CA	10	12	1,833	0,575-5,878	0,378
CC	6	17	0,520	0,150-1,752	0,363
Total de Individuos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-486 A/C (rs1736933)					
A	62	10	1,607	0,608-4,287	0,408
C	54	14	0,622	0,233-1,643	0,408
Total de Alelos	116	24			
AA	21	4	1,135	0,263-5,161	1,000
CA	20	2	2,632	0,465-19,334	0,385
CC	17	6	0,415	0,099-1,728	0,294
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-483 A/G (rs149890776)					
A	61	22	1,109	0,137-7,216	1,000
G	5	2	0,902	0,139-7,295	1,000
Total de Alelos	66	24			
AA	29	11	0,659	0,026-7,738	1,000
GA	3	0	2,869	0,146-1774,309	0,902
GG	1	1	0,344	0,008-13,940	1,000
Total de Indivíduos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-483 A/G (rs149890776)					
A	43	22	0,558	0,073-3,348	0,750
G	7	2	1,791	0,299-13,703	0,750
Total de Alelos	50	24			
AA	20	11	0,364	0,014-4,085	0,670
GA	3	0	3,889	0,194-2419,484	0,709
GG	2	1	0,957	0,057-29,714	1,000
Total de Indivíduos	25	12			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	43	61	0,504	0,128-1,927	0,414
G	7	5	1,986	0,519-7,821	0,414
Total de Alelos	50	66			
AA	20	29	0,552	0,106-2,791	0,649
GA	3	3	1,364	0,194-9,623	1,000
GG	2	1	2,783	0,180-81,948	0,804
Total de Indivíduos	25	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-483 A/G (rs149890776)					
A	43	83	0,518	0,151-1,779	0,378
G	7	7	1,930	0,562-6,638	0,378
Total de Alelos	50	90			
AA	20	40	0,500	0,108-2,308	0,508
GA	3	3	1,909	0,276-13,272	0,750
GG	2	2	1,870	0,172-20,241	0,939
Total de Indivíduos	25	45			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	104	22	0,788	0,113-4,146	1,000
G	12	2	1,269	0,241-8,842	1,000
Total de Alelos	116	24			
AA	49	11	0,495	0,021-4,639	0,846
GA	6	0	3,095	0,190-1791,582	0,785
GG	3	1	0,600	0,047-16,238	1,000
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-477 C/G (rs1736932)					
C	34	10	1,488	0,525-4,251	0,556
G	32	14	0,672	0,235-1,905	0,556
Total de Alelos	66	24			
CC	13	4	1,300	0,270-6,517	0,982
GC	8	2	1,600	0,240-13,174	0,893
GG	12	6	0,571	0,123-2,623	0,630
Total de Individuos	33	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
C	24	10	1,292	0,434-3,876	0,793
G	26	14	0,774	0,258-2,305	0,793
Total de Alelos	50	24			
CC	9	4	1,125	0,213-6,111	1,000
GC	6	2	1,579	0,216-13,883	0,936
GG	10	6	0,667	0,134-3,283	0,826
Total de Individuos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-477 C/G (rs1736932)					
C	24	34	0,869	0,390-1,935	0,852
G	26	32	1,151	0,517-2,567	0,852
Total de Alelos	50	66			
CC	9	13	0,865	0,257-2,892	1,000
GC	6	8	0,987	0,248-3,880	1,000
GG	10	12	1,167	0,350-3,888	0,993
Total de Indivíduos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
C	24	44	0,965	0,456-2,042	1,000
G	26	46	1,036	0,490-2,194	1,000
Total de Alelos	50	90			
CC	9	17	0,926	0,297-2,868	1,000
GC	6	10	1,105	0,299-4,020	1,000
GG	10	18	1,007	0,337-2,997	1,000
Total de Indivíduos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-477 C/G (rs1736932)					
C	58	10	1,400	0,530-3,732	0,603
G	58	14	0,714	0,268-1,887	0,603
Total de Alelos	116	24			
CC	22	4	1,222	0,284-5,541	1,000
GC	14	2	1,591	0,271-11,926	0,855
GG	22	6	0,611	0,149-2,501	0,650
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-443 G/A (rs17875394)					
A	15	0	14,748	1,089-8030,415	0,038*
G	51	24	0,068	0,000-0,918	0,038*
Total de Alelos	66	24			
AA	6	0	5,909	0,352-3450,394	0,391
GA	3	0	2,869	0,146-1774,309	0,902
GG	24	12	0,103	0,000-1,631	0,159
Total de Indivíduos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-443 G/A (rs17875394)					
A	5	0	5,923	0,373-3412,570	0,378
G	45	24	0,169	0,000-2,678	0,378
Total de Alelos	50	24			
AA	1	0	1,531	0,046-1108,663	1,000
GA	3	0	3,889	0,194-2419,484	0,709
GG	21	12	0,191	0,000-3,554	0,498
Total de Indivíduos	25	12			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	5	15	0,378	0,110-1,232	0,121
G	45	51	2,647	0,812-9,125	0,121
Total de Alelos	50	66			
AA	1	6	0,188	0,008-1,796	0,217
GA	3	3	1,364	0,194-9,623	1,000
GG	21	24	1,969	0,455-9,017	0,483
Total de Indivíduos	25	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-443 G/A (rs17875394)					
A	5	15	0,556	0,163-1,784	0,408
G	45	75	1,800	0,561-6,118	0,408
Total de Alelos	50	90			
AA	1	6	0,271	0,011-2,543	0,406
GA	3	3	1,909	0,276-13,272	0,750
GG	21	36	1,313	0,312-5,848	0,927
Total de Individuos	25	45			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	20	0	10,409	0,798-5599,464	0,094
G	96	24	0,096	0,000-1,253	0,094
Total de Alelos	116	24			
AA	7	0	3,641	0,229-2087,705	0,664
GA	6	0	3,095	0,190-1791,582	0,785
GG	45	12	0,135	0,000-1,974	0,237
Total de Individuos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-400 G/A (rs17875395)					
A	7	0	6,176	0,418-3470,570	0,329
G	59	24	0,162	0,000-2,395	0,329
Total de Alelos	66	24			
AA	2	0	1,984	0,088-1287,701	1,000
GA	3	0	2,869	0,146-1774,309	0,902
GG	28	12	0,207	0,000-3,598	0,519
Total de Indivíduos	33	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	4	0	4,742	0,284-2781,897	0,525
G	46	24	0,211	0,000-3,518	0,525
Total de Alelos	50	24			
AA	1	0	1,531	0,046-1108,663	1,000
GA	2	0	2,660	0,116-1735,579	1,000
GG	22	12	0,257	0,000-5,149	0,709
Total de Indivíduos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-400 G/A (rs17875395)					
A	4	7	0,733	0,168-3,027	0,878
G	46	59	1,364	0,330-5,962	0,878
Total de Alelos	50	66			
AA	1	2	0,646	0,022-9,993	1,000
GA	2	3	0,870	0,092-7,221	1,000
GG	22	28	1,310	0,233-7,903	1,000
Total de Indivíduos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	4	7	1,031	0,238-4,214	1,000
G	46	83	0,970	0,237-4,196	1,000
Total de Alelos	50	90			
AA	1	2	0,896	0,031-13,669	1,000
GA	2	3	1,217	0,130-9,961	1,000
GG	22	40	0,917	0,167-5,430	1,000
Total de Indivíduos	25	45			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-400 G/A (rs17875395)					
A	11	0	5,341	0,389-2925,335	0,378
G	105	24	0,187	0,000-2,572	0,378
Total de Alelos	116	24			
AA	3	0	1,577	0,082-967,819	1,000
GA	5	0	2,570	0,152-1506,633	0,927
GG	50	12	0,238	0,000-3,696	0,562
Total de Individuos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-399 G/A (rs17875396)					
A	11	5	0,760	0,206-2,907	0,885
G	55	19	1,316	0,344-4,857	0,885
Total de Alelos	66	24			
AA	4	2	0,690	0,085-6,463	1,000
GA	3	1	1,100	0,084-30,210	1,000
GG	26	9	1,238	0,199-7,220	1,000
Total de Individuos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-399 G/A (rs17875396)					
A	6	5	0,518	0,119-2,274	0,515
G	44	19	1,930	0,440-8,411	0,515
Total de Alelos	50	24			
AA	3	2	0,682	0,073-7,058	1,000
GA	0	1	0,000	0,324-8,424	0,703
GG	22	9	2,444	0,308-19,875	0,597
Total de Indivíduos	25	12			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	6	11	0,682	0,205-2,206	0,660
G	44	55	1,467	0,453-4,889	0,660
Total de Alelos	50	66			
AA	3	4	0,989	0,154-6,038	1,000
GA	0	3	0,000	0,569-2,985	0,343
GG	22	26	1,974	0,388-11,095	0,569
Total de Indivíduos	25	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-399 G/A (rs17875396)					
A	6	16	0,631	0,203-1,887	0,510
G	44	74	1,586	0,530-4,936	0,510
Total de Alelos	50	90			
AA	3	6	0,886	0,156-4,599	1,000
GA	0	4	0,000	0,643-2,775	0,319
GG	22	35	2,095	0,454-10,884	0,463
Total de Indivíduos	25	45			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	17	5	0,653	0,194-2,309	0,653
G	99	19	1,533	0,433-5,165	0,653
Total de Alelos	116	24			
AA	7	2	0,686	0,103-5,588	1,000
GA	3	1	0,600	0,047-16,238	1,000
GG	48	9	1,600	0,283-8,318	0,825
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-391 G/A (rs17875396)					
A	8	2	1,379	0,238-10,330	1,000
G	58	20	0,725	0,097-4,209	1,000
Total de Alelos	66	22			
AA	3	1	0,803	0,082-10,607	1,000
GA	2	0	1,825	0,080-1188,640	1,000
GG	28	10	0,560	0,022-6,252	1,000
Total de Indivíduos	33	11			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	6	2	1,364	0,217-10,768	1,000
G	44	20	0,733	0,093-4,614	1,000
Total de Alelos	50	22			
AA	3	1	1,364	0,100-38,200	1,000
GA	0	0	0,440	0,000-490,981	1,000
GG	22	10	0,733	0,026-9,960	1,000
Total de Indivíduos	25	11			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-391 G/A (rs17875396)					
A	6	8	0,989	0,279-3,446	1,000
G	44	58	1,011	0,290-3,587	1,000
Total de Alelos	50	66			
AA	3	3	1,364	0,194-9,623	1,000
GA	0	2	0,247	0,000-5,240	0,720
GG	22	28	1,310	0,233-7,903	1,000
Total de Individuos	25	33			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	6	10	1,064	0,318-3,469	1,000
G	44	78	0,940	0,288-3,149	1,000
Total de Alelos	50	88			
AA	3	4	1,364	0,126-8,190	1,000
GA	0	2	0,333	0,001-6,986	0,904
GG	22	38	1,158	0,223-6,588	1,000
Total de Individuos	25	44			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-391 G/A (rs17875396)					
A	14	2	1,373	0,264-9,465	0,971
G	102	20	0,729	0,106-3,786	0,971
Total de Alelos	116	22			
AA	6	1	1,154	0,111-27,729	1,000
GA	2	0	1,018	0,045-658,006	1,000
GG	50	10	0,625	0,026-6,075	1,000
Total de Indivíduos	58	11			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-369 C/A (rs1632943)					
A	34	17	0,438	0,142-1,316	0,163
C	32	7	2,286	0,760-7,061	0,163
Total de Alelos	66	24			
AA	12	8	0,286	0,056-1,374	0,141
CA	10	1	4,783	0,500-114,612	0,261
CC	11	3	1,500	0,280-8,757	0,865
Total de Indivíduos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-369 C/A (rs1632943)					
A	30	17	0,618	0,190-1,965	0,517
C	20	7	1,619	0,509-5,267	0,517
Total de Alelos	50	24			
AA	11	8	0,393	0,073-2,014	0,348
CA	8	1	5,176	0,507-123,948	0,246
CC	6	3	0,947	0,152-6,235	1,000
Total de Indivíduos	25	12			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	30	34	1,412	0,628-3,182	0,471
C	20	32	0,708	0,314-1,591	0,471
Total de Alelos	50	66			
AA	11	12	1,375	0,417-4,553	0,751
CA	8	10	1,082	0,305-3,826	1,000
CC	6	11	0,632	0,167-2,336	0,629
Total de Indivíduos	25	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-369 C/A (rs1632943)					
A	30	51	1,147	0,536-2,461	0,839
C	20	39	0,872	0,406-1,866	0,839
Total de Alelos	50	90			
AA	11	20	0,982	0,327-2,941	1,000
CA	8	11	1,455	0,432-4,883	0,688
CC	6	14	0,699	0,198-2,406	0,722
Total de Indivíduos	25	45			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	64	17	0,507	0,175-1,426	0,236
C	52	7	1,973	0,701-5,720	0,236
Total de Alelos	116	24			
AA	23	8	0,329	0,072-1,405	0,163
CA	18	1	4,950	0,575-112,010	0,210
CC	17	3	1,244	0,259-6,659	1,000
Total de Indivíduos	58	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-355 G/A (rs191630481)					
A	7	0	6,391	0,432-3592,342	0,313
G	57	24	0,156	0,000-2,316	0,313
Total de Alelos	64	24			
AA	3	0	2,966	0,150-1835,490	0,880
GA	1	0	1,190	0,036-858,328	1,000
GG	28	12	0,252	0,000-4,625	0,663
Total de Indivíduos	32	12			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	3	0	3,611	0,200-2178,061	0,730
G	47	24	0,277	0,000-5,002	0,730
Total de Alelos	50	24			
AA	1	0	1,531	0,046-1108,663	1,000
GA	1	0	1,531	0,046-1108,663	1,000
GG	23	12	0,376	0,001-8,649	1,000
Total de Indivíduos	25	12			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-355 G/A (rs191630481)					
A	3	7	0,520	0,100-2,412	0,554
G	47	57	1,924	0,415-10,009	0,554
Total de Alelos	50	64			
AA	1	3	0,403	0,015-4,858	0,790
GA	1	1	1,929	0,033-50,2114	1,000
GG	23	28	1,643	0,226-14,373	0,909
Total de Individuos	25	32			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	3	7	0,739	0,143-3,390	0,933
G	47	81	1,354	0,295-6,989	0,933
Total de Alelos	50	88			
AA	1	3	0,569	0,022-6,777	1,000
GA	1	1	1,792	0,047-69,076	1,000
GG	23	40	1,150	0,161-9,878	1,000
Total de Individuos	25	44			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-355 G/A (rs191630481)					
A	10	0	4,923	0,354-2707,321	0,429
G	104	24	0,203	0,000-2,822	0,429
Total de Alelos	114	24			
AA	4	0	2,103	0,118-1255,486	1,000
GA	2	0	1,126	0,051-725,805	1,000
GG	51	12	0,317	0,001-5,172	0,772
Total de Individuos	57	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-297 G/A (rs781618441)					
A	32	9	1,569	0,547-4,558	0,493
G	34	15	0,638	0,219-1,829	0,493
Total de Alelos	66	24			
AA	15	4	1,667	0,350-8,307	0,699
GA	2	1	0,710	0,043-21,805	1,000
GG	16	7	0,672	0,144-3,063	0,805
Total de Individuos	33	12			

Polimorfismo	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-297 G/A (rs781618441)					
A	16	9	0,833	0,267-2,614	0,931
G	32	15	1,200	0,382-3,749	0,931
Total de Alelos	48	24			
AA	8	4	0,973	0,192-4,996	1,000
GA	0	1	0,000	0,333-8,789	0,720
GG	16	7	1,429	0,274-7,495	0,903
Total de Indivíduos	24	12			
	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	16	32	0,531	0,228-1,228	0,154
G	32	34	1,882	0,814-4,381	0,154
Total de Alelos	48	66			
AA	8	15	0,600	0,174-2,036	0,517
GA	0	2	0,000	0,579-5,796	0,617
GG	16	16	2,125	0,629-7,326	0,274
Total de Indivíduos	24	33			

Polimorfismo	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
-297 G/A (rs781618441)					
A	16	41	0,598	0,270-1,316	0,228
G	32	49	1,673	0,760-3,709	0,228
Total de Alelos	48	90			
AA	8	19	0,684	0,214-2,159	0,644
GA	0	3	0,000	0,652-4,311	0,500
GG	16	23	1,913	0,610-6,110	0,324
Total de Indivíduos	24	45			
	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	48	9	1,212	0,451-3,303	0,851
G	66	15	0,825	0,303-2,217	0,851
Total de Alelos	114	24			
AA	23	4	1,353	0,315-6,134	0,899
GA	2	1	0,400	0,024-12,123	1,000
GG	32	7	0,914	0,218-3,757	1,000
Total de Indivíduos	57	12			

Polimorfismo	G-II	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-284 G/A					
A	18	2	4,091	0,790-28,160	0,110
G	44	20	0,244	0,036-1,266	0,110
Total de Alelos	62	22			
AA	9	1	4,091	0,412-96,280	0,357
GA	0	0	0,365	0,000-395,955	1,000
GG	22	10	0,244	0,010-2,427	0,357
Total de Indivíduos	31	11			
	G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
A	10	2	2,500	0,443-18,326	0,423
G	40	20	0,400	0,055-2,256	0,423
Total de Alelos	50	22			
AA	4	1	1,905	0,156-50,268	0,977
GA	2	0	2,447	0,105-1602,062	1,000
GG	19	10	0,317	0,013-3,462	0,559
Total de Indivíduos	25	11			

Polimorfismo	G-III	G-II	OR	IC	<i>p</i>
-284 G/A					
A	10	18	0,611	0,230-1,605	0,380
G	40	44	1,636	0,623-4,351	0,380
Total de Alelos	50	62			
AA	4	9	0,466	0,101-2,029	0,407
GA	2	0	6,702	0,315-4272,384	0,435
GG	19	22	1,295	0,336-5,089	0,906
Total de Individuos	25	31			
	G-III	G-I + G-II	OR	IC	<i>p</i>
A	10	20	0,800	0,311-2,029	0,766
G	40	64	1,250	0,493-3,213	0,766
Total de Alelos	50	84			
AA	4	10	0,610	0,138-2,524	0,652
GA	2	0	9,043	0,430-5741,061	0,290
GG	19	32	0,990	0,270-3,686	1,000
Total de Individuos	25	42			

Polimorfismo	G-II + G-III	G-I	OR	IC	<i>p</i>
-284 G/A					
A	28	2	3,333	0,684-22,106	0,175
G	84	20	0,300	0,045-1,462	0,175
Total de Alelos	112	22			
AA	13	1	3,023	0,335-70,162	0,517
GA	2	0	1,055	0,047-682,377	1,000
GG	41	10	0,273	0,012-2,430	0,384
Total de Indivíduos	56	11			

Fonte: elaborado pela autora 2017.

ANEXO A – 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 B – 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 quantia 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 imunoreguladora, 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 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 _____ Nº PRONTUÁRIO: _____

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: (). Eurodescendente (). Afrodescendente

(). Asiático descendente (). Indígena descendente

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

Observação: _____

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 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 1º grau (). prima paterna 1º 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

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 Indivíduos-Controles

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

IDENTIFICAÇÃO

--

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 () 1° grau incompleto () 1° grau completo

() 2° grau incompleto () 2° grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência: Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Eurodescendente () Afrodescendente

() 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

DISTÚRBIO RENAL: () Sim () Não

DISTÚRBIO PULMONAR: () Sim () Não

DISTÚRBIO 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 E – Extração do DNA Genômico – Método Salting-out (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988)

As amostras de sangue periférico (cerca de 8 mL) previamente coletadas por punção venosa, foram centrifugadas (*Centrifuge 206 BL Excelsa II*®) a 3000 RCF (1835 RPM) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA), para a separação dos componente sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos. Esses componentes sanguíneos foram alíquotados, identificados e estocados a -20°C. Os leucócitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. O plasma e o concentrado de hemácias não foram utilizados nesse estudo.

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, TA- Temperatura Ambiente (*Merck*®);
- 8) Etanol 70%, TA (*Merck*®).

Procedimento

Para cada amostra, foram colocados 100 µL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5 mL (tipo *ependorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL Solução de Lise I em cada um desses microtubos.

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D, Eppendorf*®) a 13400 RCF (12000 RPM) durante 4 minutos a TA. 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, foi acrescentado 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, do

tipo *vórtex*, e a cada tubo foi acrescentado 130 μL de NaCl 6 M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400 RCF por 5 minutos a TA.

Novos microtubos de 1,5 mL foram identificados e, para esses, 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 por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300 μL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400 RCF por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, a temperatura ambiente, *overnight*.

Após a secagem dos precipitados, foi adicionado 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.