

Leili Daiane Hausmann

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E DE ASSOCIAÇÃO DE
POLIMORFISMOS DO COMPLEXO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDADE COM O CÂNCER DE MAMA
EM MULHERES DE SANTA CATARINA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final com nota de 10 pelo Curso de Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Yara Costa Netto Muniz

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Iliada Rainha de Souza

FLORIANÓPOLIS
2012

HAUSMANN, L. D.

Análise epidemiológica e de associação de polimorfismos do Complexo Principal de Histocompatibilidade com o câncer de mama em mulheres de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2012.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)

87p.

1. Câncer de mama. 2. *HLA-G*. 3. *AluYHG*. 4. Desequilíbrio de ligação.

Leili Daiane Hausmann

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E DE ASSOCIAÇÃO DE
POLIMORFISMOS DO COMPLEXO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDADE COM O CÂNCER DE MAMA
EM MULHERES DE SANTA CATARINA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final com nota de 10 pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 10 de Dezembro de 2012

Dr.^a Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

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

Dr.^a Ilíada Rainha de Souza, Coorientadora,
Universidade Federal de Santa Catarina

Ma. Cíntia Callegari Côelho,
Universidade Federal do Paraná

Bióloga Mariáh Damiani da Silva,
Universidade Federal de Santa Catarina

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

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão por todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina onde realizei meu curso de graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), órgãos financiadores que possibilitam a realização de nossos projetos de pesquisa.

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

Aos indivíduos e instituições envolvidos nesta pesquisa, aos funcionários do Hospital Universitário, do Hospital Santo Antônio de Blumenau e da Maternidade Carmela Dutra. Principalmente aos médicos, Braulio Leal Fernandes e Kátia Regina Beckauser, pelo auxílio no contato com as pacientes e pela dedicação para que estes aceitassem participar deste estudo.

À minha orientadora, Dra. Yara Costa Netto Muniz, pela paciência, compreensão, por estar sempre acessível e disposta a ensinar, pela confiança que sempre depositou em mim. Também pela amizade e pelo exemplo como profissional. Uma torcedora do Avaí admirável.

À minha coorientadora professora Dra. Ilíada Rainha de Souza, por ter aberto as portas do seu laboratório e por ter confiado na minha capacidade. Pela oportunidade de crescimento e aprendizado, e, sobretudo, por me ensinar valores que vão além dos conhecimentos científicos e que contribuíram muito para a minha formação como pessoa.

À banca avaliadora deste trabalho pela leitura e dedicação, pelas dicas e correções. Dra. Andrea Rita Marrero pela colaboração na realização deste e de outros trabalhos, pelos ensinamentos e pelas boas gargalhadas. Me. Cíntia Callegari Coêlho, minha primeira orientadora, pela ENORME paciência, pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pelas tranças, pelas novelas (Vale a Pena Ver de Novo entre géis e PCRs) e pela amizade que quero levar pra sempre. Me. Mariáh Damiani, a orientadora mais “xuxulita”, por seus ensinamentos que vão além do laboratório, pela paciência e por sempre ser tão acessível. Obrigada por deixar o ambiente onde você está sempre mais feliz.

Aos colegas do LAPOGE, atuais e os que já foram, por auxiliarem de alguma forma na elaboração deste trabalho com o ensino das técnicas, coletas de amostras, extrações de DNA e por contribuírem para formação de um grupo tão bacana durante os três anos da minha iniciação científica. À Me. Bibiana Sgorla de Almeida por toda a ajuda, carinho e paciência. À Me. Ticiania Della Justina Farias por ter sido tão presente, sempre esclarecendo minhas dúvidas. Ao Guilherme pela ajuda com o inglês.

Ao Dr. Erick Castelli pela parceria, pelas contribuições na definição e otimização das técnicas e por ser tão disponível.

Às minhas amigas, irmãs e colegas de TCC, Amanda e Gabriela, pelos momentos maravilhosos que passamos juntas, pelas conversas, pelo carinho e pelo incentivo.

Aos grandes amigos que conquistei durante a graduação, Mayara, Camille, Rafaela, Bruna e Victor, pelos ótimos momentos que passamos juntos, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Às amizades feitas nos cursos e congressos durante minha vida acadêmica, pela troca de experiências, culturas, sotaques e conhecimento.

Aos meus amigos de longa data que sempre me apoiaram e me deram força pra continuar.

Em especial:

Aos meus pais, Marlene e Wilmar, pelo amor e dedicação imensuráveis, pelo esforço e apoio para que eu sempre pudesse me dedicar aos estudos e ir atrás dos meus sonhos. Ao meu irmão, David, pelo amor, brigas e amizade.

À toda família pelo enorme carinho.

RESUMO

O câncer de mama é uma doença multifatorial que resulta de interações complexas entre fatores genéticos, imunológicos, ambientais, comportamentais, hormonais e reprodutivos. Alguns fatores de risco já são bem estabelecidos, como, idade avançada, gênero feminino, menarca antes dos 12 anos de idade, menopausa tardia, uso de anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal, nuliparidade, histórico familiar e herança genética. Sabe-se que as células tumorais alteram o microambiente para facilitar o escape do sistema de imunovigilância, sendo que, dentre as alterações está à alta expressão de HLA-G. O *HLA-G* possui na sua 3'UTR um sítio polimórfico de inserção ou deleção de um fragmento de 14pb, relacionado com a estabilidade e expressão do gene. Assim, objetivou-se genotipar um polimorfismo de inserção *Alu*, *Alu_yHG*, numa região intergênica próxima do *HLA-G*, em 232 pacientes e 232 controles (pareados por gênero e idade) e verificar a influência deste polimorfismo na patogênese da doença juntamente com o polimorfismo *HLA-G14pb*In/Del*. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por PCR e visualizada em gel de agarose. Foram realizados cálculos das frequências alélicas e genotípicas, análises de associações, de haplótipos e de combinações haplotípicas. Após as análises foram encontradas associações do polimorfismo *Alu_yHG* e o risco de desenvolver câncer de mama para o genótipo **Presença/Presença* OR=0,007 ($p=0,000$; IC95%=0,003-0,014). Para os fatores de risco obteve-se associação de risco com histórico familiar OR=2,283 ($p=0,000$; IC95%= 1,487-3,511), hábito tabagista OR=2,399 ($p=0,000$; IC95%= 1,503-3,839), utilização de contraceptivo oral por mais de 5 anos OR=1,681 ($p=0,011$; IC95%= 1,124-2,514), amamentar por menos de 6 meses OR=1,538 ($p=0,037$; IC95%=1,025-2,311). Obteve-se uma associação de proteção para nuliparidade OR=0,025 ($p=0,000$; IC95%=0,014-0,045). Analisando os haplótipos formados pelos polimorfismos *HLA-G14pb*In/Del* e *Alu_yHG* não se encontrou nenhuma associação significativa. Levando em consideração as combinações haplotípicas encontrou-se associação para **Del-Presença*/**Del-Presença* (OR= 2,079; IC95%= 1,111-3,911; $p= 0,020$) e **In-Ausência*/**Del-Presença* (OR= 0,454; IC95%= 0,256-0,803; $p= 0,006$). Conclui-se que estes polimorfismos precisam se mais amplamente estudados quanto às suas relações com o câncer de mama e

os fatores de risco envolvidos, assim como, as relações entre os polimorfismos na busca de um bom marcador genético.

Palavras-chave: Câncer de mama. Fatores de risco. *HLA-G*. *AluYG*. Desequilíbrio de ligação.

ABSTRACT

Breast cancer is considered a multifactorial disease that results from complex interactions between genetic, immunological, environmental, behavioral, hormonal and reproductive factors. Some risk factors are already well established, such as being woman, advanced age, menarche before 12 years of age, late menopause, contraceptive use, hormone replacement therapy, nulliparity, family history and genetic inheritance. It is known that tumor cells alters the microenvironment to facilitate the escape from immunosurveillance, whereas, included among the alterations, are the high expression of HLA-G. The 14-bp insertion/deletion (indel) polymorphism located in the 3' UTR of the *HLA-G* gene plays a role in stability and gene expression. For this study, we aimed to infer the *Alu* genotype (insertion *Alu*_{YG} polymorphism), present in an intergenic region near the *HLA-G*, in a cohort of 232 patients and 232 controls (matched for gender and age), and determining the influence of this polymorphism in the pathogenesis of the disease along with the polymorphism *14pbIn/del. The DNA samples were extracted from whole blood, and the genotyping was carried out by PCR, whereas visualization was made by 1% agarose gel. Calculations of allele and genotype frequencies were performed, as well as association analysis, haplotype inference and haplotype combinations. After the analysis, associations were found with the *Alu*_{YG} polymorphism and the risk of developing breast cancer for genotype Presence/ Presence, OR = 0.007 ($p = 0.000$, 95% CI 0.003 to 0.014). Furthermore, for risk factors, were obtained association with family history OR = 2.283 ($p = 0.000$, 95% CI 1.487 to 3.511); smoking habit, OR = 2.399 ($p = 0.000$, 95% CI 1.503 to 3.839); use of oral contraceptives for more than 5 years, OR = 1.681 ($p = 0.011$, 95% CI 1.124 to 2.514), and breastfeed for less than 6 months, OR = 1.538 ($p = 0.037$, 95% CI 1.025 to 2.311). The association for nulliparity was protective against the risk factor, OR = 0.025 ($p = 0.000$, 95% CI 0.014 to 0.045). When analyzing the haplotypes formed by indel polymorphism 14pb and the *Alu* insertion *Alu*_{YG}, no significant association was found. Considering the haplotype combinations, associations were found for *Del-Presence/ *Del-Presence (OR = 2.079, 95% CI 1.111 to 3.911, $p = 0.020$) and *In-Absence/ *Del-Presence (OR = 0.454 95% CI = 0.256-0.803, $p = 0.006$). The findings indicate that these polymorphisms need to be more widely studied, particularly regarding their relationship with breast cancer and the risk

factors involved, as well as the relationship between polymorphisms in the search for new and better genetic markers.

Keywords: Breast cancer. Risk factors. *HLA-G*. *AluYHG*. Linkage disequilibrium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 CÂNCER	21
1.2 CÂNCER DE MAMA.....	21
1.2.1 Fisiopatologia.....	21
1.2.2 Epidemiologia	23
1.2.3 Fatores de risco e de proteção.....	23
1.2.4 Genética do câncer de mama.....	25
1.2.5 Resposta imune e susceptibilidade ao câncer de mama	25
1.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE ...	26
1.3.1 Gene <i>HLA-G</i>	27
1.3.2 Inserção <i>Alu</i> no MHC	29
1.3.3 Inserção <i>Alu</i> <i>YHG</i> e <i>14pb*In/Del</i> do <i>HLA-G</i> no MHC	30
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	33
4.3 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	34
4.3.1 Extração do DNA genômico	34
4.3.1.1 Reagentes e Soluções	34
4.3.1.2 Procedimento.....	34
4.3.2 Reação em cadeia da polimerase.....	35
4.3.2.1 Reagentes e Soluções	36
4.3.2.2 Procedimento.....	36
4.3.3 Análise do produto amplificado	37
4.4 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA....	38
4.4.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg	38
4.4.2 Estimativas das frequências alélicas e genotípicas.....	38
4.4.3 Análises de associação.....	39
4.4.4 Determinação dos haplótipos.....	39
4.4.5 Desequilíbrio de Ligação.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	41
5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	44
5.2.2 Frequências alélicas, genotípicas e análises de associação....	44

5.2.3 Associação dos dados epidemiológicos e fatores de risco para o câncer de mama.....	49
4.2.4 Associação considerando haplótipos e combinações haplotípicas	55
4.2.5 Desequilíbrio de ligação entre 3'UTR <i>HLA-G 14pb*In/Del</i> e <i>AluyHG</i>	58
4.2.6 Frequência dos alelos da inserção <i>AluyHG</i> em diferentes populações.....	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
7 REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido indivíduos-controles.....	74
ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido paciente (casos)	77
ANEXO C – Questionário indivíduos-controles.....	80
ANEXO D – Questionário pacientes câncer de mama	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação do tecido mamário evidenciando ductos e lóbulos. Fonte: adaptado de ACS, 2012b.22
- Figura 2: O MHC Humano. A localização da região do MHC humano no cromossomo 6 (6p21.3), a disposição dos genes dentro das classes II, III e I e em amarelo destaque para a região estudada neste trabalho (adaptado de Cambridge Journals, 2003).26
- Figura 3: Imagem da sequência de uma região do cromossomo 6 humano com destaque para a inserção *Alu_yHG* (destacado). A primeira sequência (referência BV681147) contém a inserção e a segunda sequência (referência BV681146) não contém a inserção (KULSKI *et al.*, 2001).36
- Figura 4: Imagem de eletroforese em gel de agarose 1,5% visualizado por transiluminador UV. Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos podem ser visualizados: 218pb e 540pb. Nas raias 1 e 3 observa-se a presença de duas bandas (fragmentos de 218pb e 540pb) indicando que o indivíduo é heterozigoto, tem a presença da inserção *Alu_yHG* em um dos cromossomos e a ausência em outro cromossomo (genótipo **Presença/Ausência*). Na raia 2 observa-se apenas uma banda (fragmento de 540pb) indicando que o indivíduo homozigoto, com a presença da inserção *Alu_yHG* nos dois cromossomos (genótipo **Presença/Presença*). Nas raias 4 e 5 observa-se apenas uma banda (fragmento de 218pb) indicando que o indivíduo é homozigoto, com a ausência da inserção *Alu_yHG* nos dois cromossomos (genótipo **Ausência/Ausência*).37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a identificação do polimorfismo inserção <i>Alu_yHG</i> , segundo Kulski <i>et al.</i> , 2001.....	35
Tabela 2: Frequências alélicas e genótípicas para inserção <i>Alu_yHG</i> , em casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença do polimorfismo e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%)	45
Tabela 3: Classificação da amostra de casos de acordo com o polimorfismo <i>Alu_yHG</i> e os fatores de risco, cálculos de associação (OR), valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%).....	46
Tabela 4: Associação dos fatores de risco entre pacientes e controles com o desenvolvimento do câncer de mama, cálculos de associação (OR), valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%).....	51
Tabela 5: Associação dos fatores de risco positivos para o câncer de mama e o Grau de Elston, usando cálculos de associação (OR), valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%).....	56
Tabela 6: Haplótipos considerando os polimorfismos <i>14pb*In/Del</i> da 3'UTR do <i>HLA-G</i> e <i>Alu_yHG</i> , para as populações de casos e controle, frequências, cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e <i>p</i>	57
Tabela 7: Frequências dos alelos e genótipos de <i>Alu_yHG</i> em diferentes populações.	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Classificação e distribuição percentual de frequência de pacientes e controles por ancestralidade informada.	42
Gráfico 2: Classificação e distribuição percentual das frequências de escolaridade entre pacientes e controles.....	43
Gráfico 3: Caracterização epidemiológica do grupo pacientes quanto à idade.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA1	Câncer de mama 1 início precoce, do inglês <i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	Câncer de mama 2 início precoce, do inglês <i>Breast cancer 2, early onset</i>
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CLI	Carcinoma lobular invasivo
CLIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DEL	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
g	Força centrífuga
HER2/neu	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
IN	Inserção
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KIR	Receptor semelhante à imunoglobulina das células <i>natural killer</i> , do inglês <i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LINEs	Elementos longos intercalados, do inglês <i>long interspersed elements</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
miRNAs	micro RNAs
mRNA	RNA mensageiro
NETI	Núcleo de Estudos da Terceira Idade
NK	Células <i>Natural Killer</i>
n	Número amostral
OR	Razão de Chances, do inglês <i>Odds Ratio</i> ,
p	Probabilidade
pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRPE	Pró-reitoria de Pesquisa e Extensão
rpm	Rotações por minuto
SINEs	Elementos curtos intercalados, do inglês <i>short interspersed elements</i>
sHLA-G	HLA-G solúvel
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TRH	Terapia de reposição hormonal
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URR	Região reguladora a montante, do inglês <i>upper regulatory region</i>
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>untranslated region</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum a proliferação e o crescimento descontrolado de células anormais (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS, 2012a). Assim, uma célula anormal, com descontrole do ciclo celular, poderá dar origem a um tumor, ou neoplasia. Um tumor é considerado um câncer apenas se for maligno, ou seja, se as células tiverem adquirido a capacidade de invadir tecidos adjacentes (ALBERTS *et al.*, 2010). Desta forma, quando células anormais adquirem a capacidade de se espalhar pra outros órgãos, ocorre um processo chamado de metástase, que representa a maior causa de morte por câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2012).

O câncer é considerado uma doença de etiologia complexa por apresentar causa multifatorial, ou seja, pode ser atribuído a uma série de fatores externos (exposição à radiação, agentes químicos e organismos infecciosos) e fatores internos (mutações e polimorfismos genéticos herdados, níveis hormonais e a condição imunológica do indivíduo). Estes fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para promover o desenvolvimento do câncer (ACS, 2012a).

No Brasil, as estimativas do INCA para o ano de 2012, válidas também para 2013, apontam a ocorrência de 518.510 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes serão os cânceres da pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas de ocorrência da doença (INCA, 2011).

1.2 CÂNCER DE MAMA

1.2.1 Fisiopatologia

Câncer de mama caracteriza-se por se desenvolver no tecido mamário, que é constituído de glândulas, capazes de produzir leite, lóbulos e ductos que conectam os lóbulos ao mamilo. O restante da mama é constituído por tecido conectivo, adiposo e linfático (Figura 1) (ACS, 2012b).

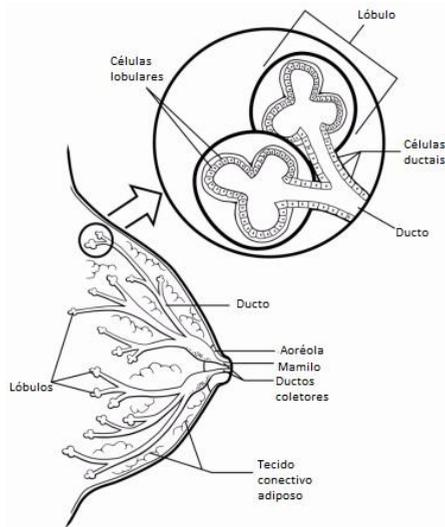


Figura 1: Representação do tecido mamário evidenciando ductos e lóbulos. Fonte: adaptado de ACS, 2012b.

Os tumores malignos de mama podem ser chamados de: carcinoma, quando iniciam em tecidos epiteliais; adenocarcinoma, quando iniciam em tecidos glandulares; ou sarcoma, quando iniciam em tecido conectivo (ACS, 2012b).

Os carcinomas mamários são classificados em não invasivo, ou *in situ*, quando se confinam aos ductos ou lóbulos e não se espalham para os tecidos adjacentes da mama ou de outras partes do corpo. E em invasivo, ou infiltrante, quando ultrapassa os limites do tecido mamário e invade áreas próximas. Podemos dividir o carcinoma mamário em quatro categorias (BREASTCANCER.ORG, 2012; NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI, 2012):

- Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): é o mais frequente dos tumores de mama não invasivos e é considerado o primeiro estágio para o câncer. Representa um crescimento descontrolado de células que estão confinadas no ducto mamário.
- Carcinoma lobular *in situ* (CLIS): crescimento celular anormal, cujo início se dá nos lóbulos mamários. Não é um câncer propriamente dito, mas aumenta as chances de que o portador desenvolva um câncer no futuro.

- Carcinoma ductal invasivo (CDI): é o tipo mais comum de câncer de mama. Cerca de 80 a 90% dos cânceres são dessa categoria. Tem início nos ductos e invade o tecido mamário vizinho.
- Carcinoma lobular invasivo (CLI): é o segundo tipo de câncer de mama mais comum. Ele tem início nos lóbulos e invade os tecidos adjacentes. Com o tempo, pode se espalhar para os linfonodos e possivelmente para outras áreas do corpo.

Segundo FISHER (1977), o câncer de mama é uma doença sistêmica, heterogênea e de comportamentos clínicos distintos. Os fatores prognósticos e preditivos são essenciais na determinação da conduta no tratamento do câncer de mama. Os principais fatores são: comprometimento de linfonodos, considerado um dos mais importantes parâmetros diagnóstico; tamanho do tumor, que está relacionado com a frequência de metástases em linfonodos; Grau de Elston, onde são analisados grau de formação tubular e glandular, grau de pleomorfismo nuclear e contagem mitótica; presença de receptores hormonais, como receptor para estrogênio, progesterona, ou ambos; expressão de HER2 (fator de crescimento epidermal 2, do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), proteína encontrada em alguns tipos de células cancerosas (ABREU e KOIFMAN, 2002; ACS, 2012b; ELSTON e ELLIS, 1991; RAKHA e ELLIS, 2011; SOONTRAPORNCHAI *et al.*, 2007).

1.2.2 Epidemiologia

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais frequente em entre as mulheres. A cada ano 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil as estimativas para o ano de 2012 (válidas para 2013) apontam para ocorrência de 52.680 casos novos de câncer de mama (52 casos a cada 100 mil mulheres). No Estado de Santa Catarina a incidência do câncer de mama é de 51,38 casos a cada 100 mil mulheres e em Florianópolis a ocorrência é de 60,11 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011).

1.2.3 Fatores de risco e de proteção

Ser mulher e possuir idade avançada são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Noventa e cinco por cento dos novos casos e 97% das mortes por câncer de mama ocorreram em mulheres com mais de 40 anos de idade. O risco aumenta se há histórico pessoal ou familiar da doença, especialmente com parentes de

primeiro grau (mãe, irmã ou filha) acometidas, e quanto maior for o número de parentes acometidos (ACS, 2011).

Outro fator de risco importante é a exposição prolongada a elevados níveis de hormônios estrogênio e progesterona (ACS, 2011; INCA, 2011). O principal efeito destes hormônios é estimular a proliferação celular principalmente em órgãos femininos como o útero e a mama, assim células com um potencial cancerígeno, devido a mutações, podem se multiplicar (MITRUNEN e HIRVONEM, 2003). Uma maior exposição a estes hormônios acontece em mulheres com: menarca precoce (menor que 12 anos); menopausa tardia (iniciada após os 50 anos de idade); primeira gestação após os 30 anos de idade; nuliparidade; uso prolongado de anticoncepcionais e uso de terapia de reposição hormonal (ACS, 2011; INCA, 2011).

O número de ciclos ovarianos está diretamente associado ao risco de desenvolver o câncer de mama, este risco é diminuído cerca de 15% a cada ano de retardo do início da menarca, e é aumentado aproximadamente 3% a cada ano de retardo da menopausa. Sabe-se que a menopausa artificial apresenta efeito semelhante à menopausa natural (INCA, 2011).

A exposição ao tabaco é um dos fatores de risco mais estudados, mas a relação entre câncer de mama e tabagismo ainda permanece controversa. A fumaça do tabaco contém carcinógenos e metabólitos que foram encontrados em fluidos da mama de fumantes. Contudo, o fumo também tem efeitos antiestrogênicos que, paradoxalmente, atuam na redução do risco de câncer de mama (REYNOLDS *et al.*, 2004). Mulheres regularmente expostas ao cigarro, mesmo fumantes passivas, apresentaram um aumento no risco de desenvolver câncer de mama, em oposição àquelas que nunca se expuseram ao tabaco (JOHNSON, 2005).

Exposição à radiação ionizante, consumo de bebidas alcoólicas e sedentarismo também são fatores que levam a um maior risco no desenvolvimento do câncer de mama. O excesso de peso e a obesidade são graves fatores de risco para o desenvolvimento de vários tipos de cânceres, dentre eles o câncer de mama. O risco de câncer de mama aumenta para mulheres em fase de pós-menopausa que possuem índice de massa corpórea (IMC) acima do normal (>25). Isso ocorre devido ao aumento proporcional dos níveis séricos de estrona e estradiol – a produção do estrogênio circulante em mulheres em pós-menopausa ocorre primeiramente a partir do tecido adiposo (ACS, 2012a; INCA, 2011).

A amamentação é considerada um fator de proteção para o câncer de mama (INCA, 2011). Este efeito pode estar relacionado à redução no tempo de exposição à ação de hormônios sexuais, que se encontram diminuídos durante este período (INUMARU *et al.*, 2011).

1.2.4 Genética do câncer de mama

O câncer de mama é considerado uma doença multifatorial que resulta de interações entre fatores genéticos, imunológicos, ambientais, comportamentais, hormonais e reprodutivos (INCA, 2011).

O câncer de mama pode ser classificado como hereditário quando há um maior envolvimento do componente genético, pela herança de genes de alta penetrância, cujos produtos participam no reparo, na replicação e na transcrição do DNA. Os mais conhecidos são os genes *BRCA1* e *BRCA2*, que se mutados, aumentam para até 85% as chances de desenvolver câncer de mama. Na população em geral, essas mutações são responsáveis por cerca de 5 a 10% da incidência de câncer de mama. Os demais cânceres de mama são denominados esporádicos, onde diversos fatores atuam em conjunto com vários genes de baixa penetrância. Estes genes possuem papel importante para o entendimento da etiologia multifatorial do câncer de mama (ACS, 2012a; DUFLOTH *et al.*, 2005; INCA, 2011).

1.2.5 Resposta imune e susceptibilidade ao câncer de mama

O crescimento de células malignas é determinado, em grande parte, por sua capacidade de proliferar e invadir tecidos do hospedeiro (ABBAS *et al.*, 2008). Para se esquivar da resposta imune e sobreviver, os tumores devem desenvolver mecanismos que bloqueiem a elaboração e recepção de sinais pró-inflamatórios, inibindo a resposta imune e induzindo tolerância (ROBINSON *et al.*, 2001).

Genes cujos produtos exercem função crítica na regulação da resposta imune, como aqueles do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) têm um papel essencial nos mecanismos de defesa contra a carcinogênese. Uma vez que os polimorfismos dos genes MHC resultam em diferenças funcionais das moléculas expressas e, conseqüentemente, na apresentação de antígenos às células T, alguns polimorfismos particulares podem predispor a doenças imune-relacionadas, incluindo susceptibilidade a alguns tipos de câncer (ABBAS *et al.*, 2008). A perda e/ou alterações da expressão de HLA (do inglês *Human Leukocyte*

Antigen, muitas vezes citado como região sinônima do MHC humano) de classe I em muitos tumores sólidos, como o câncer de mama, têm sido estudadas e consideradas como uma das rotas pela qual os tumores evadem da resposta imune (GHADERI *et al.*, 2001).

1.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

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

Em humanos, o MHC foi nomeado de Antígeno Leucocitário Humano (HLA), e essas moléculas são expressas pelos leucócitos, mas não pelos eritrócitos, sendo descoberto na década de 1950 em pacientes politransfundidos (HVIID, 2006).

A denominação HLA refere-se ao conjunto gênico mapeado no cromossomo 6 (6p21.3), em uma região de aproximadamente 3,6 megabases de DNA onde estão localizados mais de 200 genes (Figura 2) (CASTELLI *et al.*, 2011). Essa porção do genoma foi subdividida em regiões I, II e III, levando-se em consideração a estrutura e função dos produtos moleculares (HORTON *et al.*, 2004).

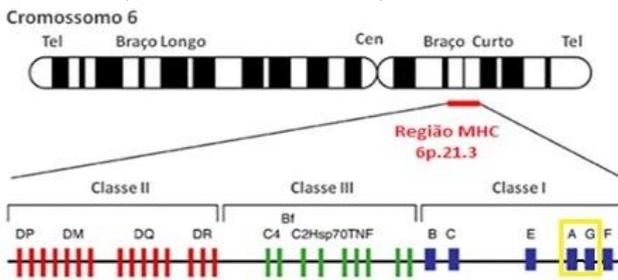


Figura 2: O MHC Humano. A localização da região do MHC humano no cromossomo 6 (6p21.3), a disposição dos genes dentro das classes II, III e I e em amarelo destaque para a região estudada neste trabalho (adaptado de Cambridge Journals, 2003).

Seis *loci* gênicos foram descritos na região de classe I. Os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (clássicos ou de classe Ia) com expressão

constitutiva na membrana celular de quase todas as células nucleadas. Os *loci HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (não clássicos ou de classe Ib) são menos polimórficos que os classe Ia e apresentam expressão celular restrita. Além destes, os *loci HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*, são caracterizados como pseudogenes, isto é, sem produto proteico associado (FAINARDI *et al.*, 2003; FISCHER e MAYR 2001; RIZZO *et al.*, 2012).

1.3.1 Gene *HLA-G*

A molécula *HLA-G* é expressa na interface materno-fetal, superfície de células do trofoblasto (CAROSELLA e HORUZSKO, 2007), células fetais endoteliais (BLASCHITZ *et al.*, 2011) e fluido amniótico (HAMMER *et al.*, 1997), conferindo uma proteção imunológica (BLASCHITZ *et al.*, 2011). Foi descrita, primeiramente, como receptores das células *natural killer* (NK) semelhantes a imunoglobulinas em células uterinas, contribuindo para tolerância materno-fetal (ROUAS-FREISS *et al.*, 1997). O *HLA-G* caracteriza-se ser pouco polimórfico, quando comparado com os de classe Ia, possuir distribuição limitada a certos tecidos, ser transcrito de forma alternativa e possuir propriedades biológicas de imunotolerância (CAROSELLA *et al.*, 2008).

Esta molécula apresenta propriedades imunossupressoras com função de lise celular em células NK e T, através da ligação a receptores como, por exemplo, receptor KIR2DL4 (MENIER *et al.*, 2002), sendo que seu nível de expressão está associado a diversas condições clínicas. Em indivíduos saudáveis, um nível basal da transcrição do gene *HLA-G* é observado na maioria das células e tecidos. No entanto, a tradução em proteínas tem localização tecidual restrita ao trofoblasto, timo, córnea, unha, pâncreas, matriz e os precursores eritroides e endoteliais. A proteína *HLA-G*, também, pode ser encontrada em situações de gravidez, após o transplante de órgãos, transformações malignas, infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes, sugerindo que fatores microambientais controlem sua expressão nas células e tecidos modificados (CAROSELLA *et al.*, 2008).

O gene *HLA-G* é composto por oito éxons e sete íntrons, porém o éxon sete é sempre removido durante o processamento (*splicing*), estando ausente no mRNA maduro e portanto com comportamento semelhante a íntron. Além disso, o códon de parada (*stop codon*) está localizado no éxon seis, e o éxon oito não é traduzido, portanto esse

segmento gênico tem sido considerado a região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA maduro (DONADI *et al.*, 2011).

Até o momento, o gene *HLA-G* apresenta 50 alelos descritos, agrupados em 16 variantes proteicas encontradas em todas as isoformas e duas proteínas modificadas pelos alelos nulos (INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECT - IMGT/HLA Database, 2012). Em contraste com a região codificadora, um grau elevado de variabilidade é observado na 3' UTR (CASTELLI *et al.*, 2011).

Os polimorfismos do gene *HLA-G* têm sido associados com várias desordens, entre elas tumores (CASTELLI *et al.*, 2008). Dependendo dos polimorfismos encontrados no gene *HLA-G* e em regiões regulatórias, assim como a presença de fatores endógenos e microambientais, a expressão de *HLA-G* pode ser aumentada ou reduzida. Teoricamente, qualquer tecido pode expressar *HLA-G*, mas em condições normais apenas alguns apresentam expressão. É preciso salientar que a expressão de *HLA-G* pode ser vantajosa ou prejudicial, visto que esta é uma molécula imunomoduladora, capaz de diminuir a resposta imune quando expressa. Condições patológicas em que uma intensa resposta imune é desejável, como em doenças virais e em tumores, a alta expressão de *HLA-G* é prejudicial. Em contraste, quando uma intensa resposta imune é indesejável, a alta expressão de *HLA-G* é essencial, como em doenças autoimunes, situações de transplante e gravidez. A região 3'UTR exibe variações de nucleotídeos que podem influenciar os níveis de expressão de *HLA-G* e, conseqüentemente, sua distribuição da resposta em tecido saudável ou patológico (DONADI *et al.*, 2011).

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

O polimorfismo de presença (inserção) ou ausência (deleção) de um fragmento de 14pb tem sido associado, em amostras de trofoblasto, à menor produção de mRNA tanto para as isoformas ligadas à membrana quanto para as solúveis (HVIID, 2006). Isto porque os mRNA do *HLA-G* com a presença destes 14pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') são

associados à produção de transcritos alternativos com deleção de 92pb (HVIID e CHRISTIANSEN, 2005), portanto menores e, por isso, mais estáveis do que quando a ausência dos 14pb é encontrada (DONADI *et al.*, 2011; ROUSSEAU *et al.*, 2003). Este *splicing* alternativo é, provavelmente, não só dirigido pela presença dos 14pb no transcrito primário, como pode ser uma consequência da presença de outros polimorfismos que estejam em desequilíbrio de ligação com este polimorfismo (DONADI *et al.*, 2011).

1.3.2 Inserção *Alu* no MHC

Transposons são sequências do genoma que são móveis, ou seja, que são capazes de se transportar para diferentes locais no interior do genoma (LEWIN, 2009). Também conhecidos como elementos transponíveis, são capazes de criar rearranjos inovadores no genoma, sendo agentes de variação genética (HARTL e CLARK, 2010). Os elementos transponíveis eucarióticos enquadram-se em duas classes: classe 1, os retrotransposons e classe 2, os transposons. Quase metade do genoma humano deriva-se de elementos de transposição, sendo em grande maioria de retrotransposons e subdivididos em dois tipos, elementos longos intercalados, ou LINEs (do inglês *long interspersed elements*), e elementos curtos intercalados, ou SINEs (do inglês *short interspersed elements*) (GRIFFITHS *et al.*, 2008). Os retrotransposons se caracterizam por durante o processo de transposição utilizarem como molécula intermediária um RNA, que depois é transcrito reversamente em DNA de fita dupla por meio de uma transcriptase reversa (HARTL e CLARK, 2010; NOVICK *et al.*, 1996).

Os SINEs mais abundante em humanos são as inserções *Alu*, sendo que constituem mais de 10% do genoma humano (GRIFFITHS *et al.*, 2008). Inserções *Alu* são assim chamadas por terem sido primeiramente descritas como uma porção repetitiva de DNA que exibia um sítio de restrição para a enzima *Alu* (HOUCK *et al.*, 1979). Esses elementos possuem aproximadamente 300pb, com dois braços praticamente idênticos, divididos por uma região rica em adenina (KRIEGS *et al.*, 2007; WATKINS *et al.*, 2001). As sequências *Alu* ocorrem em alta frequência dentro de domínios não codificantes, por exemplo, regiões intergênicas, íntrons e UTRs 5' e 3' (BAILEY e SHEN, 1993; DANIELS e DEININGER, 1985; KORENBERG e RYKOWSKI, 1988).

Todas as inserções *Alu*, em um *locus*, são idênticas por descendência, devido à improbabilidade de o fenômeno de inserção

ocorrer duas vezes exatamente no mesmo *locus* (BATZER e DEININGER, 1991). Este fato torna as inserções *Alu* ferramentas úteis para a análise da reconstrução histórica de populações humanas e dos eventos demográficos pertinentes a estas (SHEDLOCK e OKADA, 2000).

Os elementos *Alu* são classificados em três famílias principais, designadas segundo o tempo de surgimento estimado: J para famílias antigas, S para intermediárias e Y para as mais novas (BATZER *et al.*, 1996). Os membros da família *AluY* são possíveis candidatos para investigar as origens dos haplótipos humanos ancestrais, grupos étnicos e associação à doenças (KULSKI *et al.*, 2002). Seis subfamílias são descritas para *AluY* no genoma humano (BATZER *et al.*, 1990), dentre elas, *AluYa5*, a subfamília em que se encontra a inserção *AluyHG*, objeto do presente trabalho (KULSKI *et al.*, 2002).

1.3.3 Inserção *AluyHG* e *14pb*In/Del* do *HLA-G* no MHC

O MHC apresenta um forte desequilíbrio de ligação entre os genes e regiões não codificadoras, sendo considerada a região mais variável do genoma humano (JONGENEEL *et al.*, 1991; WALSH *et al.*, 2003; MALKKI *et al.*, 2005; KULSKI e DUNN, 2005; YAO *et al.*, 2009). Essa variabilidade pode ser associada a diversas doenças, especialmente aquelas com forte componente imunológico (DEININGER e BATZER, 1999; DEGHAIDE *et al.*, 2009). Porém, essa variabilidade genética não se distribui uniformemente ao longo do complexo, especialmente na região de classe I. Como dito anteriormente o gene *HLA-G* é caracterizado por uma baixa variabilidade quando comparado aos demais genes de classe I, como, por exemplo, o *HLA-A* que é considerado de intensa variabilidade. Entre estes dois genes foi descrito o polimorfismo aqui estudado, *AluyHG* (CASTRO *et al.*, 2000). Diante do peculiar comportamento dessa região genômica, faz-se importante o estudo de marcadores genéticos deste complexo, como, por exemplo, os polimorfismos *AluyHG* e *14pb*In/Del* da 3' UTR do gene *HLA-G* (KULSKI e DUNN, 2005; TROWSDALE, 2011) com objetivo entender melhor a interação e o desenvolvimento da patologia.

2 JUSTIFICATIVA

Observando dados epidemiológicos e estatísticos sobre o câncer de mama, pode-se constatar que se trata de uma doença de importância mundial. Além dos prejuízos para a saúde pública, observam-se os danos psicológicos incalculáveis causados às mulheres acometidas pelo câncer de mama, que veem o símbolo de sua feminilidade e maternidade ser, muitas vezes, destruído por esta doença.

Apesar de grandes avanços para a melhoria do controle do câncer de mama nos últimos anos, a luta permanece, ainda havendo a necessidade de maior conhecimento sobre sua etiologia e seus fatores de risco.

Diante da importância do MHC para a saúde humana, faz-se relevante analisar a possível associação entre o polimorfismo *Alu_yHG* e o câncer de mama, bem como sua associação com o polimorfismo *14pb*In/Del* da 3'UTR do gene *HLA-G*. Recentes estudos demonstraram um elevado nível ectópico de HLA-G em células de pacientes com câncer de mama, evidenciando o sHLA-G (HLA-G solúvel) como potencial biomarcador de associação tumoral para a detecção precoce de câncer de mama (CHEN *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2010; KLEINBERG *et al.*, 2006; SAYED *et al.*, 2010). Levando em consideração que os dois polimorfismos analisados neste trabalho estão próximos entre si, busca-se conhecer melhor o padrão de desequilíbrio de ligação e, desta forma, contribuir para identificação de *loci* marcadores da região.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as frequências de polimorfismos situados no MHC humano, em mulheres com câncer de mama e em mulheres sem evidência de carcinoma mamário, visando obter parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ampliar o número de amostras existentes no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), através da coleta de material biológico e informações epidemiológicas.
- Verificar se há associação de fatores de risco (menarca precoce, hábito tabagista, idade da primeira gestação depois dos 30 anos, uso de contraceptivo, amamentação por menos de 6 meses, histórico familiar de câncer de mama, uso de terapia de reposição hormonal, menopausa tardia e nuliparidade) para o desenvolvimento do câncer de mama entre o grupo casos (mulheres com câncer de mama) e o grupo controle (mulheres sem evidência de carcinoma mamário).
- Otimizar as técnicas para a genotipagem do polimorfismo inserção *Alu_yHG*.
- Calcular as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo inserção *Alu_yHG*, tanto no grupo casos quanto no grupo controle.
- Verificar se há associação entre alelos e genótipos com o desenvolvimento do câncer de mama, incluindo dados epidemiológicos.
- Verificar se o polimorfismo inserção *Alu_yHG* está em desequilíbrio de ligação com um *loci* da 3'UTR do gene *HLA-G* (*14pb*In/Del*).
- Verificar se há associação entre haplótipos (inserção *Alu_yHG* e *14pb*In/Del* da 3'UTR do gene *HLA-G*) e combinações haplotípicas com o desenvolvimento do câncer de mama.
- Comparar as frequências alélicas e genotípicas observadas com dados descritos na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, coordenado pela Dra. Iliada Rainha de Souza, intitulado “Câncer de Mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes na população do estado de Santa Catarina”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), no parecer nº 349/05, de 26/06/2006; pelo CEP da Maternidade Carmela Dutra em 20 de Julho de 2007; e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob parecer nº. 027/2006 e registro 13312, de 24 de Janeiro de 2007. Para dar continuidade a este projeto mais abrangente, ele sofreu emendas que foram aprovadas, conforme cita o ofício de nº 107/CEPSH/PRPE/09, da UFSC.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras foram constituídas de 232 pacientes com câncer de mama, atendidas pelo Hospital Universitário (HU) – UFSC e pela Maternidade Carmela Dutra de Florianópolis e Hospital Santo Antônio de Blumenau que constituem o grupo casos. O grupo controle é constituído de 232 mulheres sem evidência de carcinoma mamário, voluntárias participantes do Núcleo de Estudos da Terceira Idade (NETI) da UFSC.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXOS A e B) os dados familiares e epidemiológicos dos indivíduos foram obtidos durante entrevistas realizadas com questionários estruturados (ANEXOS C e D). Em seguida, as amostras de sangue periférico (cerca de 8ml) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico utilizado na obtenção dos dados genéticos, transportadas e armazenadas a 4°C, para o posterior processamento, no LAPOGE. As amostras biológicas e os questionários obtidos nesta pesquisa foram catalogados e constituem um banco de amostras e dados, de pacientes com câncer de mama e de indivíduos do grupo controle, do LAPOGE.

Alguns dos dados coletados durante as entrevistas e disponíveis nos questionários foram considerados neste trabalho, tais como: gênero, idade e ancestralidade, que foram utilizados para caracterização das amostras e idade da menarca, idade da menopausa, tempo de

amamentação, utilização de contraceptivos, idade da primeira gestação, uso de terapia de reposição hormonal, paridade, histórico familiar de câncer e hábito tabagista, utilizados como fatores de risco neste trabalho. Para este estudo a ancestralidade foi determinada de acordo com as características fenotípicas observadas pelo entrevistador e dados informados pelo próprio indivíduo. O dado clínico Grau de Elston do tumor, foi obtido através de prontuários médicos das pacientes e foi utilizado para análise de associação com alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama.

4.3 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.3.1 Extração do DNA genômico

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (Centrifuge 206 BL Excelsa II®) a 3000g (1835rpm) durante 15 minutos em temperatura ambiente (TA), para a separação dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos. Estes componentes sanguíneos foram aliquotados, identificados e estocados a -20°C. A camada de leucócitos foi utilizada para a extração do DNA genômico por conter a maior proporção de células nucleadas. O plasma e o concentrado de hemácias não foram utilizados neste estudo.

4.3.1.1 Reagentes e Soluções

- Solução de lise I (Tris-HCl 0,01M; Sacarose 0,32M; MgCl₂ 0,0025M; Triton X 100 – 1%).
- Solução de lise II (Tris-HCl 0,01M; KCl 0,05M; MgCl₂ 0,0025M; Nonidet 1%; TWEEN 20 – 1%).
- SDS 10%.
- Solução de perclorato de sódio 5,0M.
- Solução saturada de NaCl 6,0M.
- TE (Tris-HCl 1M; EDTA 0,5M).
- Álcool isopropílico absoluto.
- Etanol 70%.

4.3.1.2 Procedimento

A extração de DNA foi realizada usando o método de *salting out* modificado, baseado em MILLER *et al.* (1988). Para cada amostra,

foram colocados 100µl da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5ml (tipo *Eppendorf*), utilizando micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, 1,0ml de solução de lise I foi adicionado em cada um destes microtubos. As amostras foram homogêneas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D, Eppendorf®*) a 13400g (12000 rpm) durante 4 minutos a TA e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando somente a presença dos glóbulos brancos. Posteriormente, foi acrescentado ao precipitado de leucócitos 300µl de solução de lise II, 10µl de SDS e 75µl de perclorato de sódio. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, a cada tubo foi acrescentado 130µl de solução saturada de NaCl e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 minutos a TA. Novos microtubos de 1,5ml foram identificados e, para estes, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foi adicionado 300µl de álcool isopropílico absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300µl de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a TA, por 12 horas (ou *overnight*). Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100µl de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 minutos e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

4.3.2 Reação em cadeia da polimerase

O fragmento, contendo ou não a inserção *Alu*yHG, foi amplificado utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) realizada em um Termociclador Mastercycler® (*Eppendorf*). Os *primers* empregados foram obtidos na literatura (Tabela 1). A sequência da região do cromossomo 6 contendo a inserção *Alu*yHG com 322pb está destacada na Figura 3.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados para a identificação do polimorfismo inserção *Alu*yHG, segundo Kulski *et al.*, 2001.

Polimorfismo	Iniciadores	Sequência
<i>Alu</i> yHG	<i>Primer F</i>	5' - CAGGACAACCAGTAAAGATGCTGG - 3'
	<i>Primer R</i>	5' - GCTTCAGTTAACATGCAAGTTTATGCC - 3'

Sequência do cromossomo 6 com a inserção AluHG (referência BV681147):

```

1   AGTGGGGAAT TCATTCATGG GCTATCTATC CAGAGTTGTT TATAGACATA TTCTTTCAAG
61  TTTGTATTCA GGGTTGATGT CACATACACA TTTATACATG CTGTTTTATG TTTAAGTGTT
121 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGAGACGGA GTCTCGCTCT GTCGCCCAGG
181 TCGGACTGCG GACTGCAGTG GCGCAATCTC GGCTCACTGC AAGCTCCGCT TCCCGGGTTC
241 ACGCCATTCT CCTGCCCTCAG CCTCCCGAGT AGCTGGGACT ACAGGCGCCC GCCACCGCGC
301 CCGGCTAATT TTTTGTATTT TTAGTAGAGA CGGGGTTTCA CCTTGTTAGC CAGGATGGTC
361 TCGATCTCCT GACCTCATGA TCCACCCGCC TCGGCCTCCC AAAGTGCTGG GATTACAGGC
421 GTGAGCCACA TGTTAAAGTG TTTTATATTT TTGGTTAGCC CTTTATCATT GTTAAACAAA
481 GTTGTCAATTA G

```

Sequência do cromossomo 6 sem a inserção AluHG (referência BV681146):

```

1   AGTGGGGAAT TCATTCATGG GCTATCTATC CAGAGTTGTT TATAGACATA TTCTTTCAAG
61  TTTGTATTCA GGGTTGATGT CACATACACA TTTATACATG CTGTTTTATG TTTAAGTGTT
121 TTTATATTTT GGTTAGCGCT TTATCATTGT TAAACAAAGT TGTCATTAG

```

Figura 3: Imagem da sequência de uma região do cromossomo 6 humano com destaque para a inserção *AluHG* (destacado). A primeira sequência (referência BV681147) contém a inserção e a segunda sequência (referência BV681146) não contém a inserção (KULSKI *et al.*, 2001).

4.3.2.1 Reagentes e Soluções

- Água ultrapura.
- dNTPs 10mM de cada.
- MgCl₂ 50mM.
- Tampão de PCR (10X: 0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl).
- Primer Forward (10µMol).
- Primer Reverse (10µMol).
- DMSO 98% (Dimetilsulfóxido).
- Taq Platinum® 5U/µl.

4.3.2.2 Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados, em tubos de 0,6µl (tipo *Eppendorf*): 16,70µl de água; 0,50µl de dNTPs (0,2mM de cada); 0,75µl de MgCl₂ (1,5mM); 2,00µl de Tampão de PCR (0,8X); 0,30µl de *Primer R* (3pmol); 0,30µl de *Primer F* (3pmol); 0,20µl de *Taq Platinum*® (1U/µl) e 3,00µl de DNA (em torno de 200ng). Estas amostras foram colocadas no termociclador e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e, em seguida, a 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 50 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos (adaptado de Kulski *et al.*, 2001).

4.3.3 Análise do produto amplificado

Após a amplificação por PCR, em uma pequena porção do produto (4µl) foi adicionado o corante fluorescente GelRed™ (2µl de corante) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, juntamente com uma amostra proveniente da PCR sem DNA (controle negativo), uma amostra de um indivíduo com genotipagem conhecida (controle positivo) e um marcador de peso molecular de 100pb. Após a sua solidificação, o gel foi introduzido na cuba e imerso por uma solução de Tampão TBE 1x. A corrida foi realizada em uma voltagem fixada em 95 V por 30 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi registrado pelo fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro® e visualizado em foto. A anotação da leitura do genótipo foi feita considerando o tamanho dos fragmentos (218pb para produtos com a ausência da inserção *Alu*YG e 540pb para produtos com a presença da inserção *Alu*YG) (Figura 4). Os resultados genéticos dos indivíduos foram classificados de acordo com os resultados das análises do produto amplificado em: genótipo **Presença/Presença* (indivíduos com a presença da inserção *Alu*YG nos dois cromossomos), genótipo **Presença/Ausência* (indivíduos com a presença da inserção *Alu*YG em um dos cromossomos e a ausência no outro) e **Ausência/Ausência* (indivíduos com a ausência da inserção *Alu*YG nos dois cromossomos).

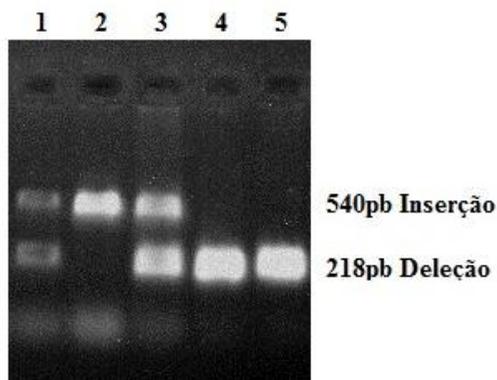


Figura 4: Imagem de eletroforese em gel de agarose 1,5% visualizado por transiluminador UV. Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos podem ser visualizados: 218pb e 540pb. Nas raias 1 e 3 observa-se a presença de duas bandas (fragmentos de 218pb e 540pb) indicando que o indivíduo é

heterozigoto, tem a presença da inserção *Alu*yHG em um dos cromossomos e a ausência em outro cromossomo (genótipo **Presença/Ausência*). Na raia 2 observa-se apenas uma banda (fragmento de 540pb) indicando que o indivíduo homozigoto, com a presença da inserção *Alu*yHG nos dois cromossomos (genótipo **Presença/Presença*). Nas raias 4 e 5 observa-se apenas uma banda (fragmento de 218pb) indicando que o indivíduo é homozigoto, com a ausência da inserção *Alu*yHG nos dois cromossomos (genótipo **Ausência/Ausência*).

4.4 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.4.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

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

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

Na qual:

x_i é a frequência do alelo “i”;

x_j é a frequência do alelo “j”;

$2 x_i x_j$ é a frequência esperada do heterozigoto ij.

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o uso do programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Foi realizado um teste baseado na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, onde o valor de p corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado.

4.4.2 Estimativas das frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas (x_i) e genotípicas (X_{ii}) de cada *loci*, em casos e controle foram estimadas utilizando o programa GENEPOP® (RAYMOND e ROUSSET, 1995) versão 3.4, de acordo com as seguintes equações:

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

$$X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Nas quais:

x_i é a frequência do alelo “i”;

X_{ii} é a frequência do genótipo “ii”;

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

4.4.3 Análises de associação

Com base em tabelas de contingência 2x2 foi verificada a associação de determinados genótipos e fatores de risco com a suscetibilidade ao câncer de mama através do índice de *odds ratio* (OR) ou razão de chances. O Intervalo de Confiança (IC) adotado foi de 95% e o $p=0,05$ foi considerado o valor limite de significância. A OR foi calculada segundo a fórmula $OR = (ad)/(bc)$. A condição “a” representa os indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse e “d” indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse, enquanto que “b” é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse e “c” o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse (WOOLF, 1955).

A OR pode ser compreendida como a razão das probabilidades e é comumente utilizada em estudos epidemiológicos para descrever o dano provável que pode ser causado pela exposição a um fator de risco. Quando o valor da *odds ratio* é maior que 1 e o intervalo de confiança não inclui o número 1 e o valor de $p \leq 0,005$, pode-se dizer que esta característica é um fator de risco. Quando o valor da *odds ratio* for menor que 1 o intervalo de confiança não incluir o 1 e o valor de $p > 0,05$, este pode ser considerado fator de proteção. Para este teste foi utilizado o software EpiMax Table Calculator (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2012).

4.4.4 Determinação dos haplótipos

Para inferir os haplótipos formados pelos dois polimorfismos da região do MHC humano (a inserção *Alu*yHG e *14pb*In/Del* da 3'UTR do gene *HLA-G*) foi utilizado o programa PHASE 2.1.1. Este programa utiliza algoritmo baesiano e apresenta melhor desempenho que os outros algoritmos (STEPHENS e DONNELLY, 2003; STEPHENS e SCHEET, 2005). Os dados do *locus* da 3'UTR do gene *HLA-G* (*14pb*In/Del*) foram obtidos através de comunicação pessoal (MARIÁH DAMIANI, 2012).

Para esta inferência, um banco contendo todos os indivíduos genotipados para os polimorfismos do presente estudo, incluindo amostras não utilizadas no presente trabalho, foi considerado. Isto porque o programa se baseia na frequência dos achados no banco disponibilizado, assim quanto maior o banco melhor são os resultados da inferência.

Somente os haplótipos cuja probabilidade da inferência foi superior a 0,90 foram considerados, justificando assim a redução do tamanho amostral nas análises de haplótipos. As frequências dos haplótipos, assim como das combinações haplotípicas foram então calculadas por contagem.

4.4.5 Desequilíbrio de Ligação

A análise de desequilíbrio de ligação (LD, do inglês LinkageDisequilibrium), associação não aleatória de alelos em diferentes loci, foi realizada utilizando-se o programa GENEPOP® (RAYMOND e ROUSSET, 1995) versão 3.4. A hipótese nula é a de que a distribuição genotípica em um *locus* é independente da distribuição em outro *locus*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra constitui-se de 464 indivíduos, sendo 232 mulheres com câncer de mama, grupo casos, e 232 mulheres sem histórico de câncer, grupo controle, todas residentes em Santa Catarina. Os dois grupos foram pareados de acordo com o gênero (gênero feminino) e a idade (com até 3 anos de diferença).

Os indivíduos dos dois grupos foram classificados quanto à ancestralidade (características fenotípicas e dados informados pelos indivíduos) (Gráfico 1). Observou-se um grande número de indivíduos na classe Euro-descendentes nos dois grupos, que pode ser explicado pelo histórico de colonização do estado de Santa Catarina, que ocorreu predominantemente por europeus (JOCHER, 1997). Na sequência, observamos uma frequência um pouco menor de indivíduos classificados como Euro/ Afro/ Ameríndio-descendentes. A presença destes componentes pode ser explicada pelo fato de a população brasileira ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de mistura, principalmente entre indivíduos europeus, africanos e ameríndios (MARRERO *et al.*, 2007; PARRA *et al.*, 2003). Foi observada uma frequência muito baixa de Afro-descendentes, Ameríndio-descendentes e Asiático-descendentes. Houve ainda, indivíduos que não declararam sua ascendência (NI).

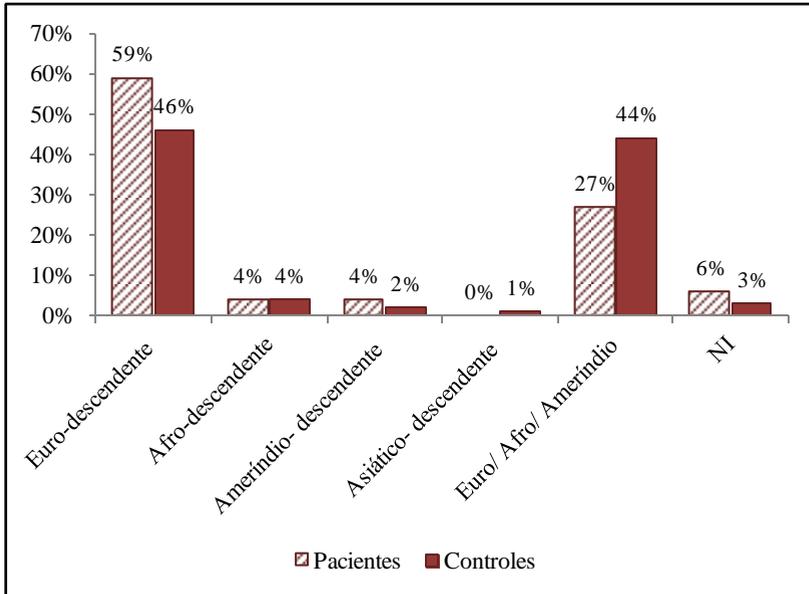


Gráfico 1: Classificação e distribuição percentual de frequência de pacientes e controles por ancestralidade informada.

Os indivíduos também foram classificados quanto à escolaridade (Gráfico 2). Observou-se uma disparidade acentuada entre os dois grupos. Há uma proporção maior de mulheres no grupo controle que possuem uma escolaridade mais elevada em relação ao grupo de pacientes. As maiores discrepâncias foram na classe fundamental incompleto (34% do grupo pacientes e 15% do grupo controle) e ensino superior (7% do grupo pacientes e 30% do grupo controle). Estes dados apontam para diferenças de acesso ao conhecimento entre as mulheres dos dois grupos, o que pode fornecer um viés às futuras análises. Estes dados podem ser explicados pelo tipo de coleta realizado. Todos os pacientes são provenientes de hospitais públicos, sendo que a maioria

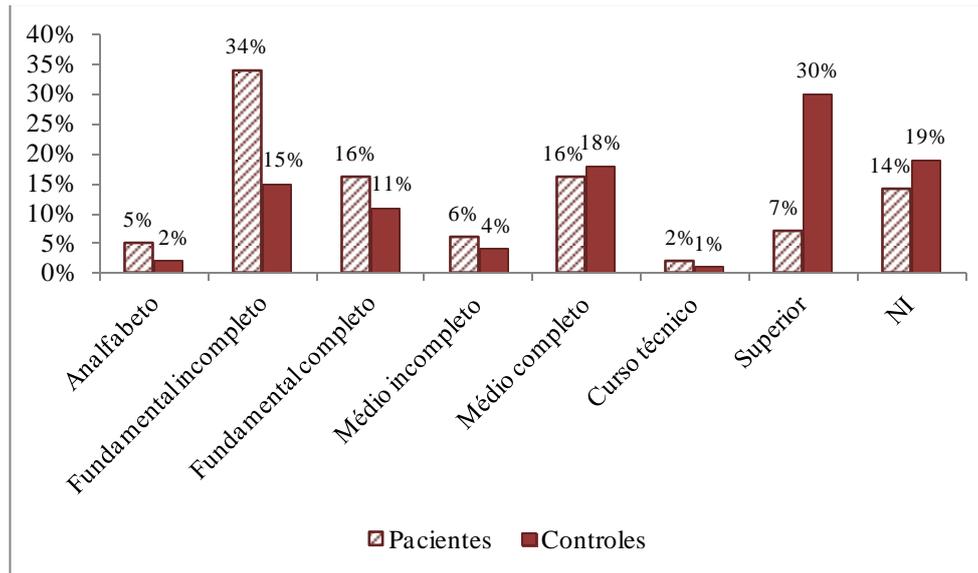


Gráfico 2: Classificação e distribuição percentual das frequências de escolaridade entre pacientes e controles.

foi atendida pelo SUS, que possui como usuários indivíduos com perfil socioeconômico inferior e que, conhecidamente, é acompanhado pelo menor grau de escolaridade. Enquanto que a maioria das mulheres que constituem o grupo controle faz parte do NETI, o que demonstra a relação dessas mulheres com a universidade e, conseqüentemente, com conhecimento, tendo maior acesso a informação.

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As distribuições das frequências do polimorfismo *AluyHG* em casos e controles estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências do polimorfismo *14pb*In/Del* da 3' UTR do gene *HLA-G*, utilizadas neste trabalho também estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.2.2 Frequências alélicas, genotípicas e análises de associação

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas da inserção *AluyHG* nos dois grupos, casos e controles, assim como da análise de associação, estão descritos na Tabela 2.

Entre os dados analisados, ressalta-se o valor de associação significativa do genótipo homozigoto **Presença/Presença* com OR=0,007 ($p=0,000$; IC95%= 0,003-0,014), indicando proteção. O polimorfismo *AluyHG* está localizado em uma região intergênica (entre os genes *HLA-G* e *HLA-A*) e ainda não se sabe se existe alguma consequência fenotípica gerada por ele. A explicação mais plausível é de que este *loci* esteja em desequilíbrio de ligação com *HLA-G* e/ou *HLA-A*, assim o alelo **Presença* pode estar segregando junto com alelos destes outros *loci* que conferem proteção ao câncer de mama.

Os resultados obtidos para os cálculos de associação no grupo de casos, considerando os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (menarca precoce ≤ 12 anos, tempo de utilização de contraceptivos via oral por mais de cinco anos, de amamentação menor que seis meses, histórico familiar e hábito tabagista), assim como a associação destes fatores com os dados genéticos do polimorfismo *AluyHG* estão representados na Tabela 3. Entre os dados apresentados nenhuma associação significativa foi observada.

Tabela 2: Frequências alélicas e genotípicas para inserção *Alu_yHG*, em casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença do polimorfismo e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de *p* e intervalo de confiança (IC, 95%).

Inserção <i>Alu_yHG</i>	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequências	OR	<i>p</i>	IC (95%)
* <i>Presença</i>	132	0,285	136	0,293	0,959	0,828	0,715-1,287
* <i>Ausência</i>	332	0,715	328	0,707	1,043	0,828	0,777-1,399
Total de Alelos	464		464				
* <i>Presença/Presença</i>	16	0,081	19	0,086	0,007	0,000*	0,003-0,014
* <i>Presença/Ausência</i>	100	0,408	98	0,414	1,036	0,926	0,705-1,522
* <i>Ausência/Ausência</i>	116	0,511	115	0,500	1,017	1,000	0,695-1,489
Total de Indivíduos	232		232				

Frequências gênicas e genotípicas (GENEPOP), análise de associação (HDS Epimax); n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança de 95%; *p*= valor de *p*. Os valores significativos estão anotados com *.

Tabela 3: Classificação da amostra de casos de acordo com o polimorfismo *Alu*yHG e os fatores de risco, cálculos de associação (OR), valores de *p* e intervalo de confiança (IC, 95%).

Fatores de risco	Polimorfismo <i>Alu</i> yHG	Sim	Não	OR	<i>p</i>	IC (95%)
Menarca precoce (<12 anos)	* <i>Presença</i>	26	105	1,110	0,789	0,644-1,908
	* <i>Ausência</i>	60	269	0,901	0,789	0,524-1,554
	Total de Alelos	86	374			
	* <i>Presença/Presença</i>	3	13	1,004	1,000	0,216-4,028
	* <i>Presença/Ausência</i>	20	79	1,189	0,735	0,580-2,433
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	20	95	0,842	0,735	0,412-1,720
	Total de Indivíduos	43	187			
TRH	* <i>Presença</i>	19	112	0,798	0,517	0,436- 1,448
	* <i>Ausência</i>	57	268	1,254	0,517	0,690- 2,294
	Total de Alelos	76	380			
	* <i>Presença/Presença</i>	0	16	0,000	0,132	0,833- 1,520
	* <i>Presença/Ausência</i>	19	80	1,375	0,473	0,647- 2,921
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	19	94	1,021	1,000	0,482- 2,166
Total de Indivíduos	38	190				
Menopausa >55 anos	* <i>Presença</i>	5	64	0,830	0,926	0,254- 2,548
	* <i>Ausência</i>	16	170	1,205	0,926	0,392- 3,937
	Total de Alelos	21	234			
	* <i>Presença/Presença</i>	1	6	1,850	1,000	0,078- 18,830
	* <i>Presença/Ausência</i>	4	52	0,714	0,843	0,165- 2,922
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	6	59	0,842	0,735	0,412-1,720
Total de Indivíduos	11	117				

Fatores de risco	Polimorfismo <i>Alu</i> YHG	Sim	Não	OR	<i>p</i>	IC (95%)
Contraceptivo oral (> 5 anos)	* <i>Presença</i>	62	68	0,758	0,219	0,494-1,163
	* <i>Ausência</i>	178	148	1,319	0,219	0,860-2,024
	Total de Alelos	240	216			
	* <i>Presença/Presença</i>	6	10	0,516	0,319	0,160-1,613
	* <i>Presença/Ausência</i>	50	48	0,893	0,772	0,510-1,562
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	64	50	1,326	0,354	0,761-2,310
	Total de Indivíduos	120	108			
Amamentação (< 6 meses)	* <i>Presença</i>	61	68	1,020	1,000	0,664-1,566
	* <i>Ausência</i>	153	174	0,980	1,000	0,638-1,505
	Total de Alelos	214	242			
	* <i>Presença/Presença</i>	7	9	0,871	0,996	0,280-2,673
	* <i>Presença/Ausência</i>	47	50	1,112	0,793	0,635-1,948
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	53	62	0,934	0,901	0,537-1,625
	Total de Indivíduos	107	121			
História familiar	* <i>Presença</i>	61	70	1,133	0,617	0,739-1,737
	* <i>Ausência</i>	143	186	0,982	0,617	0,576-1,352
	Total de Alelos	204	256			
	* <i>Presença/Presença</i>	7	9	0,974	1,000	0,313-2,988
	* <i>Presença/Ausência</i>	47	52	1,249	0,480	0,714-2,186
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	48	67	0,809	0,507	0,465-1,409
	Total de Indivíduos	102	128			

Fatores de risco	Polimorfismo <i>Alu</i> YHG	Sim	Não	OR	<i>p</i>	IC (95%)
Primeira gestação (< 30 anos)	* <i>Presença</i>	9	70	1,712	0,323	0,661- 4,367
	* <i>Ausência</i>	14	186	0,584	0,323	0,229- 1,512
	Total de Alelos	204	256			
	* <i>Presença/Presença</i>	7	9	1,280	1,000	0,057- 11,034
	* <i>Presença/Ausência</i>	47	52	2,840	0,155	0,742- 11,645
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	48	67	0,307	0,128	0,064- 1,288
	Total de Indivíduos	102	128			
Nuliparidade	* <i>Presença</i>	13	116	0,849	0,752	0,413- 1,722
	* <i>Ausência</i>	38	288	1,177	0,752	0,581- 2,422
	Total de Alelos	51	404			
	* <i>Presença/Presença</i>	1	15	0,499	0,791	0,023- 3,877
	* <i>Presença/Ausência</i>	12	86	1,156	0,892	0,473- 2,816
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	13	101	1,000	1,000	
	Total de Indivíduos	26	202			
Hábito tabagista	* <i>Presença</i>	44	86	1,062	0,871	0,674-1,670
	* <i>Ausência</i>	106	220	0,942	0,871	0,599-1,483
	Total de Alelos	150	306			
	* <i>Presença/Presença</i>	5	11	0,922	1,000	0,267-3,020
	* <i>Presença/Ausência</i>	34	64	1,153	0,719	0,636-2,089
	* <i>Ausência/ Ausência</i>	36	78	0,888	0,778	0,492-1,601
	Total de Indivíduos	75	153			

Análise de associação (HDS Epimax); n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; *p*= valor de *p*.

5.2.3 Associação dos dados epidemiológicos e fatores de risco para o câncer de mama

Em relação à idade, os indivíduos do grupo pacientes foram divididos em classes de 10 anos (Gráfico 3). A maioria das mulheres (53%) está na faixa entre 44 e 63 anos (classes 44-53 anos e 54-63 anos).

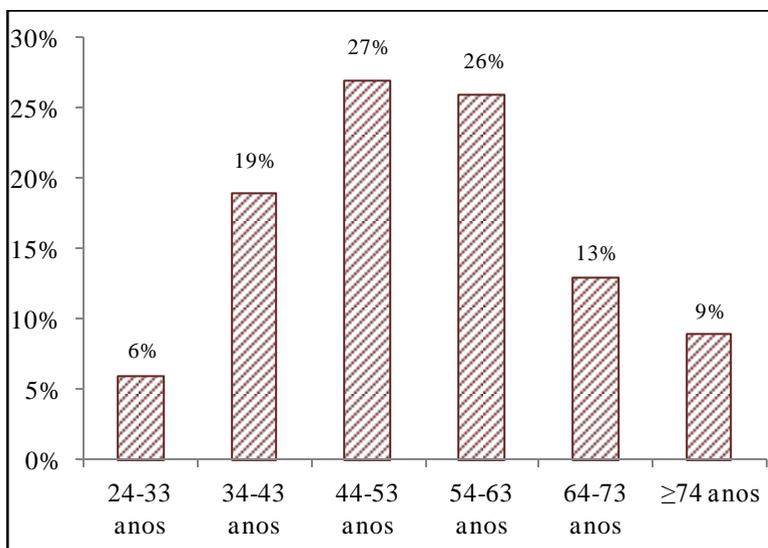


Gráfico 3: Caracterização epidemiológica do grupo pacientes quanto à idade.

A idade continua sendo o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta (INCA, 2011). Aproximadamente 80% dos carcinomas mamários ocorrem em mulheres com mais de 50 anos (YAU *et al.*, 2007). Somente 2 a 5% dos casos incidem em mulheres muito jovens (idade <35 anos) (GONZALEZ-ÂNGULO *et al.*, 2005; WALKER *et al.*, 1996). Neste estudo, o grupo de pacientes apresentou 7% dos indivíduos com idade menor que 35 anos e 57% com idade maior que 50 anos. Segundo ACS (2011) 95% dos novos casos e 97% das mortes por câncer de mama ocorrem em mulheres com idade maior que 40 anos. Neste estudo, 86% das mulheres têm 40 anos ou mais.

Outros fatores de risco são bem estabelecidos, como, por exemplo, aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a acima dos 30 anos, uso de contraceptivos orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal). Estes fatores ocasionam uma exposição prolongada aos hormônios estrogênio e progesterona que atuam no estímulo da proliferação celular e, conseqüentemente, podem propiciar o aparecimento ou crescimento de tumores (INCA, 2011). Na Tabela 4 estão apresentadas as análises de associação entre estes e outros fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama.

Tabela 4: Associação dos fatores de risco entre pacientes e controles com o desenvolvimento do câncer de mama, cálculos de associação (OR), valores de p e intervalo de confiança (IC, 95%)

Fator de risco	Pacientes (n)	Controles (n)	OR	p	IC (95%)
Menarca precoce					
<12 anos	43	35			
≥12 anos	187	166	1,091	0,826	0,648-1,838
Total de Indivíduos	230	201			
Hábito tabagista					
Sim	75	38			
Não	153	186	2,399	0,000*	1,503-3,839
Total de Indivíduos	228	224			
Idade da primeira gestação					
Depois dos 30 anos	20	20			
Antes dos 30 anos	188	152	0,808	0,639	0,400-1,634
Total de Indivíduos	208	172			
Uso de contraceptivo					
>5anos	120	80			
≤5 anos	108	121	1,681	0,011*	1,124-2,514
Total de Indivíduos	228	201			
Amamentação					
<6 meses	107	73			
≥6 meses	121	127	1,538	0,037*	1,025-2,311
Total de Indivíduos	228	200			

Fator de risco	Pacientes (n)	Controles (n)	OR	p	IC (95%)
Histórico familiar					
Sim	102	52			
Não	128	149	2,283	0,000*	1,487-3,511
Total de Indivíduos	230	201			
Terapia de reposição hormonal					
Sim	38	25			
Não	190	175	1,400	0,282	0,786-2,502
Total de Indivíduos	228	200			
Menopausa					
>55 anos	10	3			
≤55 anos	130	152	3,897	0,058	0,963-18,279
Total de Indivíduos	140	155			
Nuliparidade					
Sim	26	33			
Não	202	168	0,025	0,000*	0,014-0,045
Total de Indivíduos	228	201			

Análise de associação (HDS Epimax).; n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança de 95%; p= valor de p. Os valores significativos estão anotados com *.

Menarca precoce (<12 anos) e menopausa tardia (> 55anos) podem aumentar o risco de uma mulher desenvolver câncer de mama, pela exposição a hormônios reprodutivos produzidos por seu corpo (ACS, 2011). No presente estudo a análise de associação da menarca precoce e da menopausa tardia apresentaram resultados não significativos (OR = 1,091; IC 95% 0,648-1,838; $p = 0,826$ e OR = 3,897; IC 95% 0,963-18,279; $p = 0,058$, respectivamente). Porém, cabe ressaltar que o valor de p , quando da análise do fator menopausa, se aproximou da significância e o risco foi de quase quatro vezes mais chances de desenvolver o câncer de mama.

Número de ciclos menstruais aumentados devido à nuliparidade aumenta a probabilidade de desenvolvimento do câncer de mama (HENDERSON e FEIGELSON, 2000). Quanto maior o número de gestações menor o risco da mulher desenvolver câncer de mama, assim como para mulheres que engravidam a primeira vez depois dos 30 anos de idade (ACS, 2011). No presente estudo, quando foi analisado o fator nuliparidade entre pacientes e controles, encontrou-se um resultado significativo (OR = 0,025; IC 95% 0,014-0,045; $p = 0,000$). Este resultado indica que a nuliparidade apresenta um efeito de proteção para o câncer de mama, diferentemente dos dados da literatura. Entretanto, como comentado anteriormente, o grupo de pacientes é composto por mulheres usuárias do SUS e com nível de escolaridade menor quando comparado com o grupo controle. Assim, o fato de o grupo de pacientes ter menor quantidade de nulíparas que o grupo controle pode ser explicado pelo menor nível de escolaridade que, consequentemente, está associado ao menor acesso à informação, à prática de planejamento familiar e às práticas contraceptivas (DINIZ, 2010). Com relação ao fator de risco idade da gravidez depois dos 30 anos, não foi encontrada associação significativa (OR = 0,808; IC 95% 0,400-1,634; $p = 0,639$).

O uso prolongado de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal (TRH), com estrogênio e progesterona combinados, aumenta o risco de desenvolver e de morrer de câncer de mama. O risco também é maior para as mulheres que iniciam a TRH logo após o início da menopausa em comparação com aquelas que iniciam mais tarde (ACS, 2011; BERAL, 2011). Mulheres pós-menopausa com altos níveis de hormônios endógenos, causados pelo uso de TRH, têm cerca de duas vezes mais risco de desenvolver câncer de mama em comparação com mulheres com níveis mais baixos (KEY *et al.*, 2002; TAMIMI *et al.*, 2007). No presente estudo, encontrou-se uma associação significativa para o fator uso de contraceptivos orais (OR = 1,681; IC 95% 1,124-

2,502; $p = 0,011$), com quase duas vezes mais chances de desenvolver câncer de mama. Para o fator uso de TRH não foi observada uma associação significativa (OR = 1,400; IC 95% 0,786-2,502; $p = 0,282$).

O fator amamentação, principalmente prolongada (mais de 6 meses), é considerado protetor para o desenvolvimento do câncer de mama. Este efeito pode estar associado ao menor tempo de exposição à ação de hormônios sexuais que se encontram diminuídos no período de lactação (INCA, 2011; INUMARU *et al.*, 2011). Isso foi confirmado no presente estudo, onde esta análise apresentou um resultado significativo (OR = 1,538; IC 95% 1,025-2,311; $p = 0,037$), que representa uma associação positiva da amamentação por menos de 6 meses com um risco de quase duas vezes nas chances de desenvolver o câncer de mama.

Mulheres com histórico familiar de câncer de mama, especialmente em parentes de primeiro grau (mãe, irmã, filha, pai ou irmão), têm um maior risco de desenvolver câncer de mama. O risco aumenta se mais de um parente é acometido com a doença. O risco de desenvolver câncer de mama é de cerca de 2 vezes maior em mulheres com um parente afetado, cerca de 3 vezes maior para mulheres com dois parentes afetados e de quatro vezes maior para mulheres com três ou mais parentes afetados. O risco aumenta também, quanto mais jovem for o parente acometido (ACS, 2011; INCA, 2011). No presente estudo, o fator possuir história familiar de câncer de mama apresentou um resultado altamente significativo (OR = 2,283; IC 95% 1,487-3,511; $p = 0,000$) e o fator está associado a um risco de mais de duas vezes no desenvolvimento do câncer de mama.

A exposição ao tabaco é um dos fatores de risco mais estudados, mas a relação entre câncer de mama e tabagismo ainda permanece controversa. Mulheres regularmente expostas ao cigarro apresentaram um aumento no risco de desenvolver câncer de mama, em oposição àquelas que nunca se expõem ao tabaco (JOHNSON, 2005). Um estudo feito com quase 80 mil mulheres nos Estados Unidos da América descobriu que fumantes apresentavam um risco 16% maior de desenvolver câncer de mama do que aquelas que nunca fumaram (LUO *et al.*, 2011). Neste trabalho foi encontrada associação positiva para o hábito tabagista, com mais de duas vezes mais chances em desenvolver câncer de mama (OR = 2,399; IC 95% 1,503-3,839; $p = 0,000$).

Um recente estudo relacionou diversos fatores de risco para o carcinoma de bexiga urinária. Resultados indicaram diferenças nos padrões de danos ao DNA entre pacientes que fumavam e pacientes que

não fumavam e, conseqüentemente, uma expressão tumoral diferenciada (Castelli *et al.*, 2008). Neste estudo buscou-se entender a relação entre o hábito tabagista e outros fatores de risco e o desenvolvimento de tumores de diferentes agressividades (Tabela 5). Para isso foi utilizada a classificação de Elston, que considera como grau I os tumores bem diferenciados, grau II os levemente diferenciados e grau III os pouco diferenciados (ELSTON e ELLIS, 1991). Para as análises de associação com fatores de risco positivos, os tumores foram divididos tomando-se por base o grau I comparado com os graus II e III. Um estudo feito no Brasil identificou que tumores grau histológico II e III têm pior sobrevida que tumor grau I (FARIAS *et al.*, 2005). Nenhuma associação significativa foi observada, porém, cabe resaltar a importância de aumentarmos o número das amostras com classificação tumoral para futuras análises.

4.2.4 Associação considerando haplótipos e combinações haplotípicas

A associação com os haplótipos e combinações haplotípicas observada nos diferentes grupos, caso e controle estão descritos na Tabela 6. Quatro haplótipos foram encontrados entre os indivíduos genotipados considerando o polimorfismo *14pb*In/Del* da 3'UTR do *HLA-G* e a inserção *AluYHG*: **In-Presença*, **In-Ausência*, **Del-Presença* e **Del-Ausência*.

Tabela 5: Associação dos fatores de risco positivos para o câncer de mama e o Grau de Elston, usando cálculos de associação (OR), valores de p e intervalo de confiança (IC, 95%).

Grau de Elston	Tabagista(n)	Não tabagista (n)	OR	p	IC (95%)
I	4	8	0,795	0,989	0,175-3,426
II + III	22	35			
Total de Indivíduos	26	43			
	Amamentou <6 meses(n)	Amamentou ≥6 meses (n)	OR	p	IC (95%)
I	6	6	1,000	1,000	
II + III	29	29			
Total de Indivíduos	35	35			
	Contraceptivo >5 anos(n)	Contraceptivo ≤5 anos(n)	OR	p	IC (95%)
I	9	3	2,700	0,272	0,578- 14,194
II + III	30	27			
Total de Indivíduos	39	30			
	Com histórico familiar(n)	Sem histórico familiar(n)	OR	p	IC (95%)
I	2	10	0,207	0,080	0,028- 1,149
II + III	29	30			
Total de Indivíduos	31	40			

Análise de associação (HDS Epimax).; n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança de 95%; p = valor de p .

Tabela 6: Haplótipos considerando os polimorfismos *14pb*In/Del* da 3'UTR do *HLA-G* e *AluyHG*, para as populações de casos e controle, frequências, cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Amostra	Hap.	Ca.	f	Co.	f	OR	p	IC	Comb. Hap.	Ca.	f	Co.	f	OR	p	IC
Casos x Controles	1	18	0,059	20	0,066	0,894	0,867	0,441- 1,806	1 1	3	0,020	4	0,026	0,745	1,000	0,130- 4,017
	2	100	0,329	112	0,368	0,840	0,350	0,593- 1,190	2 2	31	0,204	27	0,178	1,186	0,661	0,644- 2,188
	3	50	0,164	54	0,178	0,911	0,746	0,585- 1,420	3 3	8	0,053	12	0,079	0,648	0,488	0,234- 1,766
	4	136	0,448	118	0,388	1,276	0,162	0,912- 1,786	4 4	38	0,250	21	0,138	2,079	0,020*	1,111- 3,911
									1 2	11	0,072	9	0,059	1,240	0,817	0,460- 3,368
									1 3	1	0,007	3	0,020	0,329	0,614	0,013- 3,585
									1 4	0	0,000	0	0,000	1,000	1,000	-
									2 3	0	0,000	0	0,000	1,000	1,000	-
									2 4	27	0,178	49	0,322	0,454	0,006*	0,256- 0,803
									3 4	33	0,216	27	0,178	1,284	0,471	0,702- 2,353
Total		304		304					Total	152		152				

n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; *p*= valor de *p*; *f*= frequência; Ca. = casos; Co. = controles; Hap.= Haplótipos; Comb. Hap.= Combinações Haplótípicas; 1= **In/ Presença*; 2= **In/ Ausência*; 3= **Del/ Presença*; 4= **Del/ Ausência*. Os valores significativos estão anotados com *.

Alelos de *HLA-G* que propiciam uma elevação da sua expressão são preferencialmente detectados em tecidos tumorais, pois favorecem o escape tumoral e, portanto, são associados a cânceres de mau prognóstico (LAMPEN e VAN HALL, 2011). Após as análises foram encontradas associações do polimorfismo e o risco de desenvolver câncer de mama para o alelo *14pb*In* OR=1,404 ($p=0,019$; IC95%=1,055-1,870) e o genótipo *14pb*In/In* OR=2,218 ($p=0,004$; IC95%=1,276-3,870). Também se encontrou proteção ao desenvolvimento da patologia *14pb*Del/Del+14pb*In/Del* OR=0,451 ($p=0,004$; IC95%=0,258-0,784).

Na análise dos haplótipos formados pelos polimorfismos *14pb*In/Del* e *AluyHG* não houve nenhuma associação significativa. Levando em consideração as combinações haplotípicas foi encontrada associação para **Del-Presença/ *Del-Presença* (OR= 2,079; IC95%= 1,111-3,911; $p= 0,020$) e **In-Ausência/ *Del-Presença* (OR= 0,454; IC95%= 0,256-0,803; $p= 0,006$).

4.2.5 Desequilíbrio de ligação entre 3'UTR *HLA-G 14pb*In/Del* e *AluyHG*

Os dois marcadores analisados neste trabalho estão na região do MHC, sendo que a inserção *AluyHG* está muito próxima do gene *HLA-G*, como mencionado anteriormente. Testou-se, neste trabalho, se os alelos do locus *AluyHG* segregam, ou não, de forma independente dos alelos do locus *HLA-G 14pb*In/Del*. A análise de desequilíbrio de ligação considerando os marcadores na população estudada não apresentou resultado estatisticamente significativo ($p= 0,578$). Assim, o resultado indica que os loci estão segregando independentemente, ou seja, não estão em desequilíbrio de ligação. Porém, este resultado não era esperado e deve ser repetido em outras amostras, de forma a estabelecer melhor o padrão de desequilíbrio de ligação desta região. Portanto, para esta amostra, o polimorfismo *AluyHG* não pode ser utilizado como marcador genético para o polimorfismo *14pb*In/Del*.

4.2.6 Frequência dos alelos da inserção *AluyHG* em diferentes populações

Neste estudo observou-se uma frequência de 0,71 para o alelo **ausência* da inserção e de 0,29 para o alelo **presença* da inserção, quando utilizou-se os resultados de todos os indivíduos (n° de amostras= 464). Em um estudo no Brasil, as frequências dos alelos da inserção

*Alu*_{YHG} foram semelhantes à encontrada em Brasília (inserção=0,24 e ausência=0,76 – n=105), assim como na comunidade afroderivada remanescente de quilombo de Kalunga (inserção= 0,30 e ausência= 0,70 – n=61) (SILVA, 2012).

O mesmo padrão foi observado em populações não brasileiras genotipadas para esse marcador (Tabela 7). Em três populações africanas (Khoi, Seleke San e Kung San) analisadas no trabalho de KULSKI e DUNN (2005) as frequências do alelo **presença* da inserção foram ainda menores. Isto é, em todos os estudos, incluindo o presente, o alelo mais frequente é a ausência de inserção. Como a condição ancestral do *locus* é a ausência de inserção, esse resultado era esperado, principalmente pelo fato dessas inserções serem mais recentes no genoma humano (SILVA, 2012).

Tabela 7: Frequências dos alelos e genótipos de *Alu_yHG* em diferentes populações.

População	n	Presença	Ausência	Presença/ Presença	Presença/ Ausência	Ausência/ Ausência	Referência
Santa Catarina	464	0,29	0,71	0,08	0,42	0,50	Presente estudo
Brasília	105	0,24	0,76	0,06	0,36	0,58	SILVA, 2012
Kalunga	61	0,30	0,70	0,09	0,42	0,49	SILVA, 2012
Australianos	105	0,30	0,70	0,09	0,42	0,49	KULSKI e DUNN, 2005
Japoneses	99	0,27	0,73	0,07	0,40	0,53	KULSKI e DUNN, 2005
Norte Tailândia	192	0,29	0,71	0,09	0,41	0,50	KULSKI e DUNN, 2005
Mongólia	41	0,22	0,78	0,05	0,34	0,61	KULSKI e DUNN, 2005
Khoi	43	0,13	0,87	0,02	0,22	0,76	KULSKI e DUNN, 2005
Seleke San	60	0,03	0,97	0,00	0,06	0,94	KULSKI e DUNN, 2005
Kung San	42	0,07	0,93	0,01	0,13	0,86	KULSKI e DUNN, 2005
Caucasianos	173	0,25	0,75	0,06	0,38	0,56	KULSKI <i>et al.</i> , 2011
Japoneses	97	0,32	0,68	0,10	0,44	0,46	KULSKI <i>et al.</i> , 2011
Afro-americanos	94	0,21	0,79	0,04	0,33	0,63	KULSKI <i>et al.</i> , 2011
Maonan (sul da China)	108	0,30	0,70	0,09	0,42	0,49	YAO <i>et al.</i> , 2009
Han (sudoeste da China)	103	0,33	0,67	0,11	0,44	0,45	YAO <i>et al.</i> , 2009
Wa (sudoeste da China)	118	0,30	0,70	0,09	0,42	0,49	YAO <i>et al.</i> , 2009
Jinuo (sudoeste da China)	108	0,27	0,73	0,07	0,40	0,53	YAO <i>et al.</i> , 2009
Guipuzcoa (norte da Espanha)	102	0,31	0,69	0,10	0,43	0,47	GARCÍA-OBREGÓN <i>et al.</i> , 2012
Navarre (norte da Espanha)	101	0,35	0,65	0,12	0,45	0,43	GARCÍA-OBREGÓN <i>et al.</i> , 2012

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises e resultados apresentadas neste estudo, conclui-se que:

- O número de amostras do LAPOGE foi ampliado.
- As técnicas para genotipagem do polimorfismo *Alu*YHG foram otimizadas.
- Este foi o primeiro trabalho que verificou as frequências do polimorfismo *Alu*YHG em amostras dos estado de Santa Catarina.
- Este trabalho foi o primeiro estudo que relacionou o polimorfismo *Alu*YHG com o desenvolvimento do câncer de mama.
- Os fatores de risco analisados e que mostraram associação positiva para o câncer de mama foram: hábito tabagista, uso de contraceptivos orais, amamentação por menos de 6 meses e possuir histórico familiar. O fator de risco nuliparidade mostrou proteção para o câncer de mama, diferentemente de estudos atuais.
- Os dados epidemiológicos analisados juntamente com o polimorfismo não mostraram estar associados significativamente com o câncer de mama.
- Não houve associações significativas com o câncer de mama ao analisar os haplótipos entre os polimorfismos *Alu*YHG e *14pb*In/Del* da 3'UTR do gene *HLA-G*.
- Quando foram analisadas as combinações haplotípicas entre os polimorfismos encontrou-se associação para **Del-Presença/ *Del-Presença* (OR= 2,079; IC95%= 1,111-3,911; $p= 0,020$) e **In-Ausência/ *Del-Presença* (OR= 0,454; IC95%= 0,256-0,803; $p= 0,006$).
- Os dois polimorfismos não estão em desequilíbrio de ligação para esta amostra, portanto *Alu*YHG não parece ser um bom marcador para o polimorfismo *14pb*In/Del* da 3'UTR do gene *HLA-G*.
- Outros estudos de associação de *Alu*YHG e *HLA-G* com câncer de mama devem ser realizados de forma a esclarecer melhor o padrão de ligação desta região genômica auxiliando na busca de *loci* marcadores.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n.1, p.113-131, 2002.

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

ALVAREZ, M.; PIEDADE, J.; BALSEIRO, S.; RIBAS, G.; REGATEIRO, F. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. **International journal of immunogenetics**, v. 36, n. 6, p. 361-366, 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Breast Cancer Overview**. Disponível em:
<<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/overviewguide/breast-cancer-overview-what-is-breast-cancer>>. Acesso em: novembro de 2012b.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Cancer Facts & Figures 2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2012a.

BAILEY, A.D.; SHEN, C.K. Sequential insertion of *Alu* family repeats into specific genomic sites of higher primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p. 7205-7209, 1993.

BATZER, M. A.; ARCOT, S.S.; PHINNEY, J.W.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; KASS, D.H.; MILLIGAN, S.M.; KIMPTON, C.; GILL, P.; HOCHMEISTER, M.; IOANNOU, P.A.; HERRERA, R.J.; BOUDREAU, D.A.; SCHEER, W.D.; SCHEER, W.D.; KEATS, B.J.B.; DEININGER, P.L.; STONEKING, M. Genetic variation of recent *Alu* insertions in human populations. **Journal of Molecular Evolution**, v.42, p.22-29, 1996.

BATZER, M. A.; DEININGER, P.L. A human-specific subfamily of *Alu* sequences. **Genomics**, v. 9, p. 481-487, 1991.

BATZER, M. A.; KILROY, G.E.; RICHARD, P.E.; SHAIKH, T.H.; DESSELLE, T.D., HOPPENS, C.L.; DEININGER, P.L. Structure and variability of recently inserted *Alu* family members. **Nucleic Acids research**, v.118, p.6793-6798, 1990.

BERAL, V.; REEVES, G.; BULL, D.; GREEN, J. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. **Journal National Cancer Institute**, v.103, n. 4, p. 296-305, 2011.

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

BREASTCANCER.ORG. **Types of Breast Cancer**. Disponível em: <<http://www.breastcancer.org/symptoms/types>>. Acesso em: outubro de 2012.

CAMBRIDGE JOURNALS. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 5, 2003.

CAROSELLA, E. D.; HORUZSKO, A. HLA-G and cancer. **Seminars in cancer biology**, v. 17, n. 6, p. 411-412, 2007.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in immunology**, v. 29, n. 3, p. 125-132, 2008.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. A Comprehensive Study of Polymorphic Sites along the HLA-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 11, p. 3069-3086, 2011.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VIANA DE CAMARGO, J.L.; DONADI, E.A. HLA-G polymorphism and transitional cell

carcinoma of the bladder in a Brazilian population. **Tissue antigens**, v. 72, n. 2, p. 149-57, 2008.

CASTRO, M.J.; MORALES, P.; MARTINEZ-LASO, J.; ALLENDE, L.; ROJO-AMIGO, R.; GONZALES-HEVILLA, M. Evolution of MHC-G in humans and primates based on three new 3' UTR polymorphisms. **Human Immunol**, v. 61, n. 11, p. 1157-1163, 2000.

CHEN, H.X.; LIN, A.; SHEN, C.J.; ZHEN, R.; CHEN, B.G.; ZHANG, X.; CAO, F.L.; ZHANG, J.G.; YAN, W.H. Upregulation of human leukocyte antigen-G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. **Human immunology**, v. 71, n. 9, p. 892-898, 2010.

CROUA-ROY, B.; AMADOU, C.; BOUISSOU, C.; CLAYTON, J.; VERENET, C.; RIBOUCHON, M.T.; PONTAROTTI, P. Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping. **Genomics**, v. 21, p. 241-243, 1994.

DANIELS, G.R.; DEININGER, P.L. Integration site preferences of the *Alu* family and similar repetitive DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 8939-8954, 1985.

DEGHAIDE, N.H.S.; RODRIGUES, M.L.V.; CASTELLI, E.C. MENDES-JUNIOR, C.T.; FIGUEIREDO, J.F.C.; DONADI, E.A. Tumor necrosis factor region polymorphisms are associated with AIDS and with cytomegalovirus retinitis. **AIDS**, v. 23, p. 1641-1647, 2009.

DEININGER, P.L.; BATZER, M.A. *Alu* Repeats and Human Disease. **Molecular genetics and Metabolism**, v. 67, p. 183-193, 1999.

DINIZ, N.C. **Gravidez na adolescência: um desafio social**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) – Campos Gerais, Minas Gerais, 2010. Disponível em: <<http://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/2336.pdf>>. Acesso em: novembro de 2012.

DONADI, E.A.; CASTELLI, E.C.; ARNAIZ-VILLENNA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 369-395, 2011.

- DUFLOTH, R.M.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J.K.; SHINZATO, J.Y.; SANTOS, C.C.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n.4, p. 192-197, 2005.
- 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.
- FAINARDI, E.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; VAGHI, L.; CASTELLAZZI, M.; MARZOLA, A.; GOVONI, V.; PAOLINO, E.; TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O.R. Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings. **Journal of Neuroimmunology**, v. 142, n. 1-2, p. 149-158, 2003.
- FARIAS, R. E.; SOUZA, A.R.; AARESTRUP, F.M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n.3, p. 209-218, 2005.
- FISHER, B. Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. **Cancer**, v.40, p.574-587, 1977.
- FISCHER, G.F.; MAYR, W.R. Molecular genetics of the HLA complex. **Wien Klin Wochenschr**, v.113, n. 20-21, p. 814-824, 2001.
- GARCÍA-OBREGÓN, S.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ-MIRANDA, A. M.; GÓMEZ-PÉREZ, L.; PARCORBO, M. M.; PEÑA, J.A. Ancestry markers from the human chromosome 6: *Alu* repeats from the MHC in autochthonous Basques. **Human Immunology**, v. 73, p. 720-725, 2012.
- GHADERI, A.; TALEI, A.; GHARESI-FARD, B.; FARJADIAN, S. H.; AMIRZARGAR, A.; VASEI, M. HLA-DRB 1 Alleles and the Susceptibility of Iranian Patients with Breast Cancer. **Pathology Oncology Research**, v.7, n.1, p. 39-41. 2001.

GONZALEZ-ÂNGULO, A.M.; BROGLIO, K.; KAU, S.W.; ERALP, Y.; ERLICHMAN, J.; VALERO, V.; THERIAULT, R.; BOOSER, D.; BUZDAR, A.U.; HORTOBAGYI, G.N.; ARUN, B. Women age <35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. **Cancer**, v. 103, n. 12, p. 2466-2472, 2005.

GRIFFITHS, A.J.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HAMMER, A.; HUTTER, H.; DOHR, G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 38, p. 150-157, 1997.

HARTL, D. L.; CLARK, A.G. **Princípios de Genética de Populações**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HEALTH DECISION STRATEGIES. EpiMax Table Calculator. Disponível em: <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso em: outubro de 2012.

HENDERSON, B. E. e FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 427-433, 2000.

HE, X.; DONG, D.D.; YIE, S.M.; YANG, H.; CAO, M.; YE, S.R.; LI, K.; LIU, J.; CHEN, J. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on alloctotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 5, p. 1459-1469, 2010.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R.C.; BRUFORD, E.A.; KHODIYAR, V.K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT JÚNIOR, C.C.; WRIGHT, M.W.; WAIN, H.M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v. 5 n. 12, p. 889-899, 2004.

HOUCK, C.M.; RINEHART, F.P.; SCHMID, C.W. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. **Journal of Molecular Biology**, v. 132, n. 2, p. 289-306, 1979.

HVIID, T. V. F.; CHRISTIANSEN, O. B. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G--possible

implications for human reproduction and autoimmune disease. **Human immunology**, v. 66, n. 6, p. 688-699, 2005.

HVIID, T.V.F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 209-232, 2006.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, L. E. da; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Review Literature and Arts of the Americas**, v. 27, n.7, p. 1259-1270, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: 118 p., 2011.

INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECT (IMGT/HLA Database). Disponível em: <
<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>>. Acesso em: outubro de 2012.

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

JOHNSON, K.C. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 619-628, 2005.

JONGENEEL, C.V.; BRIANT, L.; UDALOVA, I.A.; SEVIN, A.; NEDOSPASOV, S.A.; CAMBON-THOMSEN, A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 9717-9721, 1991.

KEY, T.; APPLEBY, P.; BARNES, I.; REEVES, G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 8, p. 606-616, 2002.

KLEINBERG, L.; FLORENES, V.A.; SKREDE, M.; DONG,

- H.P.; NIELSEN, S.; MCMASTER, M.T.; NESLAND, J.M.; SHIH, I.E.M.; DAVIDSON, B. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 449, n. 1, p. 31-39, 2006.
- KORENBERG, J. R.; RYKOWSKI, M. C. Human genome organization: *Alu*, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. **Cell**, v. 53, p. 391-400, 1988.
- KRIEGS, J. O.; CHURAKOV, G.; JURKA, J.; BROSIUS, J.; SCHIMTZ, J. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINES in Suprapimate. **Trends in genetics**, v. 23, n. 4, p. 158-161, 2007.
- KUERSTEN, S.; GOODWIN, E. B. The power of the 3' UTR: translational control and development. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 8, p. 626-637, 2003.
- KULSKI, J. K.; MARTINEZ, P.; LONGMAN-JACOBSEN, N.; WANG, W.; WILLIAMSON, J.; DAWKINS, R.L.; SHIINA, T.; NARUSE, T.; INOKO, H. The association between HLA-A alleles and an *Alu* dimorphism near HLA-G. **Journal of Molecular Evolution**, v.53, p.114-123, 2001.
- KULSKI, J. K.; DUNN, D.S.; HUI, J; MARTINEZ, P.; ROMPHRUK, A. V.; LEELAYUWAT, C.; TAY, G. K.; OKA, A.; INOKO, H. *Alu* polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles. **Immunogenetics**, v.53, p. 975-979, 2002.
- KULSKI, J. K.; DUNN, D.S. Polymorphic *Alu* insertions within the Major Histocompatibility Complex class I genomic region: a brief review. **Cytogenet Genome Research**, v. 110, p. 193-202, 2005.
- KULSKI, J.K.; SHIGENARI, A.; INOKO, H. Genetic variation and hitchhiking between structurally polymorphic *Alu* insertions and HLA-A, -B, and -C alleles and other retroelements within the MHC class I region. **Tissue Antigens**, v. 78, p. 359-377, 2011.

LAMPEN, M. H.; VAN HALL, T. Strategies to counteract MHC-I defects in tumors. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 2, p. 293-298, 2011.

LARSEN, M.H.; HVIID, T. V. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human immunology**, v. 70, n. 12, p. 1026-1034, 2009.

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

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

MALKKI, M.; SINGLE, R.; CARRINGTON, M.; THOMSON, G.; PETERSDORF, E. MHC microsatellite diversity and linkage disequilibrium among common HLA-A, HLA-B, DRB1 haplotypes: implications for unrelated donor hematopoietic transplantation and disease association studies. **Tissue Antigens**, v. 66, p. 114-124, 2005.

MARRERO, A.R.; BRAVI, C.; STUART, S.; LONG, J.C.; PEREIRA-DAS-NEVES, L.F.; KOMMERS, T.; CARVALHO, C.M.; PENA, S.D.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. Pre-and post Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. **Human Hereditary**, v. 64, p. 160–171, 2007.

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

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.11, n.16, p. 1215, 1988.

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

41, 2003.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. **What You Need To Know About™ Breast Cancer**. Estados Unidos, 2012.

NOVICK, G.E.; BATZER, M. A.; DEININGER, P.L. HERRERA, R. J. The mobile genetic element “*Alu*” in the Human Genome. **BioScience**, v.46, n.1, p. 32-41, 1996.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, JR.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D.J. Color and genomic ancestry in brazilians. **PNAS**, v.100, n.1, p. 177-182, 2003.

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. **Advances in anatomic pathology**, v. 18, n. 4, p. 255-267, 2011.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **The Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

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

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

ROBINSON, J.; WALLER, M. J.; PARHAM, P.; BODMER, J. G.; MARSCH, S. G. E. IMGT/HLA Database – a sequence database for the human major histocompatibility complex. **Nucleic Acid Research**, v. 29, n.1, p. 210-213, 2001.

ROUAS-FREISS, N.; GONÇALVES, R.M.B.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11520–11525, 1997.

ROUSSEAU, P.; DISCORDE, M.L.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14 bp Deletion-Insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1005-1010, 2003.

SAYED, D.; BADR, G.; MAXIMOUS, D.; MIKHAIL, N.N.; ABU-TARBOUSH, F.; ALHAZZA, I.M. HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. **Tissue antigens**, v. 75, n. 1, p. 40-47, 2010.

SHEDLOCK, A.M.; OKADA, N. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. **BioEssays**, v. 22, n. 2, p.148-160, 2000.

SILVA, A.C.A. **Dinâmica de Marcadores Genéticos na Região do Complexo de Histocompatibilidade**. 2012. Dissertação mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília, 2012.

Principal Humano em Populações do Centro-Oeste do Brasil

SOONTRAPORNCHAI, P.; CHANVITAN, A.; KOONTONGKAEW, S.; SUNPAWERAVONG S. The prognostic v *Alue* of p53 immunostaining in node-negative breast carcinoma. **Journal of The Medical Association of Thailand**, v. 90, n. 9, p.1833-1838, 2007.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **The American Journal of Human Genetics**, vol. 73, n.5, p.1162-1169, 2003.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. **The American Journal of Human Genetics**, vol.76, n.3, p.449-462, 2005.

TAMIMI, R.M.; BYRNE, C.; COLDITZ, G.A.; HANKINSON, S.E.

Endogenous hormone levels, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n.15, p.1178-1187, 2007.

TROWSDALE, T. The MHC, disease and selection. **Immunology Letters**, v. 137, p. 1-8, 2011.

WALSH, E.C.; MATHER, K.A.; SCHAFFNER, S.F.; FARWELL, L.; DALY, M.J.; PATTERSON, N.; CULLEN, M.; CARRINGTON, M.; BUGAWAN, T.L.; ERLICH, H.; CAMPBELL, J.; BARRETT, J.; MILLER, K.; THOMSON, G.;LANDER, E.S.; RIOUX, J.D. An Integrated Haplotype Map of the Human Major Histocompatibility Complex. **American Journal of Human Genetics**, v.73, p. 580-590, 2003.

WALKER, R.A.; LEES, E.; WEBB, M.B.; DEARING, S.J. Breast carcinomas occurring in young women (<35 years) are different. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 11, p. 1796-1800, 1996.

WATKINS, W. S.; RICKER, C. E.; BAMSHAD, M. J.; CARROLL, M. L.; NGUYEN, S.V.; BATZER, M.A.; HARPENDING, H.C.; ROGERS, A.R.; JORDE, L.B. Patterns of ancestral human diversity: an analysis of *Alu*-insertion and restriction-site polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 3, p.738-752, 2001.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annual Human Genetics**, v. 19, p. 251-253, 1955.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Cancer**. Disponível: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: outubro de 2012.

YAU, C.; FEDELE, V.;ROYDASGUPTA, R.; FRIDLAND, J.; HUBBARD, A.; GRAY, J.W.; CHEW, K.; DAIRKEE, S.H.; MOORE, D.H.; SCHITTULLI, F.; TOMMASI, S.; PARADISO, A.; ALBERTSON, D.G.; BENZ, C.C. Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone- dependent breast cancers. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 59, 2007.

YAO, Y.; SHI, L.; SHI, L.; LIN, K.; YU, L.; SUN, H.; HUANG, X.; TAO, Y.; YI, W.; LIU, S.; CHU, J. The association between HLA-A, 72

-B alleles and major histocompatibility complex class I polymorphic *Alu* insertions in four populations in China. **Tissue Antigens**, v. 73, n.6, p. 575-581, 2009.

**ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido indivíduos-
controles**

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**INDIVÍDUOS-CONTROLES**

Projetos de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide 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.

Assinaturas:

Pesquisador

responsável

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____,
fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide 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 pacientes

Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Ambulatório de Dermatologia/Psoríase – Hospital Nereu Ramos
Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de
Santa Catarina

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: *“Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”*

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** ou **(48) 3721-5154** e conversar com a

Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Cecília Menks Ribeiro.

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 pedadinho 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: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

ANEXO C – Questionário indivíduos-controles



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

QUESTIONÁRIO INDIVÍDUOS-CONTROLES

Dados Pessoais:

Data: __/__/__

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: ____ Sexo: () M () F Data de nascimento: _____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade:

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

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

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência:

Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente

() Asiático descendente () Indígena descendente

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

Observações:

Dados Familiares:

Nome do pai: _____
 Cidade onde nasceu: _____
 Descendência _____ do _____ pai:
 Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência _____ da _____ mãe:
 Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

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

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

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

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

() Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

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
DISTÚRBO RENAL: () Sim () Não
DISTÚRBO PULMONAR: () Sim () Não
DISTÚRBO HEPÁTICO: () Sim () Não

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

Grau de parentesco: _____

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

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

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

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

ANEXO D – Questionário pacientes câncer de mama



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

QUESTIONÁRIO – PACIENTES

IDENTIFICAÇÃO

Data: __/__/__ Coleta: () SANGUE () TUMOR

ENTREVISTADOR _____
 _____ MÉDICO RESPONSÁVEL
 _____ HOSPITAL _____

Dados Pessoais:

Nome: _____
 Endereço: _____
 Cidade: _____ Telefone Residencial: _____
 Telefone Trabalho: _____ Celular: _____
 Idade: _____ Sexo: () M () F Data de nascimento:

 Estado Civil: _____ Tipo de
 sangue: _____
 Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não
 Escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto
 () 1º grau completo () 2º grau incompleto
 () 2º grau completo () superior incompleto
 () superior completo () pós graduação
 Peso: _____ Altura: _____
 Cidade onde nasceu: _____
 Ascendência: Materna _____ Paterna _____
 Etnia: () Euro descendente () Afro descendente
 () Asiático descendente () Indígena descendente
 Cor da pele: () negra () mulata () amarela () branca
 Observação: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____
 Cidade onde nasceu: _____
 Ascendência _____ do _____ pai:
 Materna _____ Paterna _____
 Profissão: _____

Nome da mãe: _____
 Cidade onde nasceu: _____
 Descendência _____ da _____ mãe:
 Materna _____ Paterna _____
 Profissão: _____

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

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? (). Sim (). Não
 Frequência: (). Todos os dias (). Fim de semana
 (). Esporadicamente (Festas).

Quantidade (copos 200ml): _____

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 hormônio _____ Tempo total: _____

Observações: _____

Histórico MédicoCasos 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

DISTÚRBO RENAL: ().Sim (). Não

DISTÚRBO PULMONAR: ().Sim (). Não

DISTÚRBO HEPÁTICO: ().Sim (). Não

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

Grau de parentesco: _____

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

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

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

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