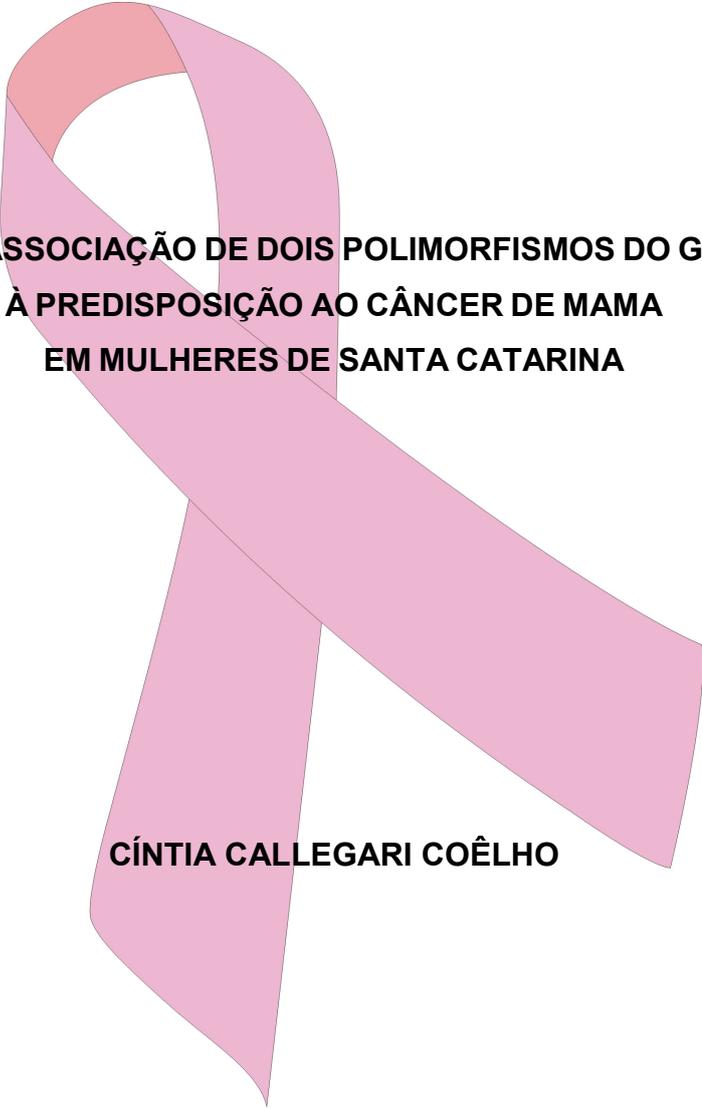




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS



**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE DOIS POLIMORFISMOS DO GENE *MTHFR*  
À PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA  
EM MULHERES DE SANTA CATARINA**

**CÍNTIA CALLEGARI COELHO**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE DOIS POLIMORFISMOS DO GENE *MTHFR*  
À PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA  
EM MULHERES DE SANTA CATARINA**

**CÍNTIA CALLEGARI COÊLHO**

Trabalho apresentado como requisito para o cumprimento da disciplina Estágio II (BIO 5156) do currículo do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: **Prof. Dra. Ilíada Rainha de Souza**  
Co-orientadora: **Ms. Lia Kubelka de Carlos Back**

Florianópolis, novembro de 2008

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo apoio incondicional, por acreditarem no meu sonho e me ajudarem a torná-lo realidade.

Ao Leandro, que além do apoio e bom humor que dispensou sempre prestou seus serviços “informáticos”.

À professora Ilíada, que foi muito mais do que orientadora durante esses 5 anos... horas e horas de conversa, dedicação, carinho e paciência que renderam não apenas esse trabalho, mas muitas lições que levarei para a vida toda.

À Lia, minha co-orientadora, que me ajudou com as técnicas, sempre esteve disposta a esclarecer minhas dúvidas e também proporcionou boas conversas.

Aos membros da banca examinadora, Maria Cecília Menks Ribeiro, Rosany Mucha Dufloth e Ana Paula Brandalize, por aceitarem meu convite e assim, garantirem críticas e sugestões preciosas para a finalização desse trabalho.

À equipe do LAPOGE, tanto os colegas atuais quanto os que vieram e já foram (valeu, Anita!!), por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável, um porto seguro dentro da Universidade. Experiências trocadas, histórias contadas, auxílios concedidos, risadas garantidas e algumas amizades que ficarão comigo para sempre.

Aos meus amigos que, de longe ou de perto, de alguma forma se fizeram presentes durante todo o tempo, mesmo quando eu estava muito ocupada (e muito ausente) realizando esse trabalho... Conversas, conselhos, filmes, cafés, bons momentos que ficam na memória e tornam cada um de vocês tão especial.

Às mulheres que gentilmente aceitaram participar da pesquisa, principalmente as pacientes, que num momento tão difícil das suas vidas colaboraram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

MUITO OBRIGADA!

Cíntia

*This is not the end. It is not even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning.*

*Winston Churchill*

## RESUMO

O câncer de mama (CAMA) é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e é o mais freqüente em mulheres. Cerca de 30% de mulheres jovens que desenvolvem câncer de mama devem apresentar um padrão genético de predisposição à doença. Polimorfismos em genes de enzimas das vias de metilação, como por exemplo, a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), podem alterar a regulação gênica, uma vez que ela é responsável por metabolizar folato e disponibilizar grupos metil para o organismo, favorecendo o desenvolvimento do CAMA através da ativação de proto-oncogenes por hipometilação de regiões promotoras, por inativação de genes supressores de tumor por hipermetilação, por alteração no padrão de metilação do gene do receptor de estrógeno e na disponibilidade de uridilatos e timidilatos para síntese e reparo de DNA. Os polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C, quando em homozigose, causam a diminuição da atividade enzimática em 35 e 60% da normal, respectivamente. Os objetivos do trabalho foram investigar a associação dos polimorfismos citados e o CAMA em mulheres de SC, em estudo caso-controle, bem como averiguar as freqüências alélicas e genóticas dos locos *MTHFR* 677 e *MTHFR* 1298. Foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos controle (n = 117) e casos (n = 125). Para a identificação da variabilidade, utilizou-se a técnica PCR-RFLP. Obtiveram-se as freqüências alélicas de 0,40 para *MTHFR* 677T nos controles e 0,34 nos casos, semelhantes a outras populações de origem européia. Para o loco *MTHFR* 1298, as freqüências do alelo C são 0,53 e 0,51 em controles e casos, respectivamente, superiores às de outras populações da literatura. As freqüências genóticas estão homogeneamente distribuídas entre controles e casos para o loco *MTHFR* 677 e para os controles no loco *MTHFR* 1298, porém os casos encontram-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentando excesso de heterozigotos. Foi encontrada associação entre as duas classes de genótipos CC AC + CT AC e a susceptibilidade de desenvolvimento do CAMA, com *OR* (*odds ratio*) = 2,079 e *p* = 0,012. Já os genótipos CC AA, CC CC e TT CC somados conferem proteção contra a doença, apresentando *OR* = 0,480 e *p* = 0,039.

Apoio: UFSC; FAPESC/SES; CNPq; CAPES.

## ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the second most frequent cancer type in the world and it is the most one in women. About 30% of young women who develop BC are expected to show genetic predisposing pattern. Polymorphisms in methylation pathways enzymes genes, such as methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), can alter genic regulation, once it is responsible for folate metabolizing and for making one-carbon groups available to the organism, easing BC to emerge through proto-oncogenes activation, promoter region hypomethylation, methylation pattern changes in estrogen receptor gene and in uridylates and thimidylates availability to DNA synthesis and repair. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms, when homozygous, lead to reduced enzyme activity to 35 and 60% of the non-mutated one, respectively. The objectives were to investigate the association of the above mentioned polymorphisms and BC in SC women, in a case-control study, as well as to verify allelic and genotypic frequencies of *MTHFR* 677 and *MTHFR* 1298. It was collected peripheral blood samples of control (n = 117) and cases (n = 125) individuals. In order to identify the variability, it was used PCR-RFLP. It was obtained allelic frequencies of 0.40 to *MTHFR* 677T in controls and 0.34 in cases, similar to other populations found in literature. To *MTHFR* 1298, the allele C frequency is 0.53 and 0.51 in controls and cases, respectively, higher than the observed in other populations of the literature. Genotypic frequencies are homogeneously distributed among cases and controls to *MTHFR* 677 locus and for controls of *MTHFR* 1298 locus, but not for cases, which are not in Hardy-Weinberg equilibrium, presenting heterozygote excess. It was found association between two genotypic classes (CC AC + CT AC) and the BC development susceptibility (*odds ratio* (OR) = 2.079 and *p*-value = 0.012). Together, genotypes CC AA, CC CC and TT CC lend protection against the disease (OR = 0.480, *p* = 0.039).

Support: UFSC; FAPESC/SES; CNPq; CAPES.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano 2008, no Estado de Santa Catarina e em Florianópolis, das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.....	16
Tabela 2: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise dos locos 677 e 1298 do gene MTHFR.....	28
Tabela 3: Distribuição das freqüências genotípica e alélica de MTHFR C677T entre controles e casos. ....	36
Tabela 4: Odds ratio de casos e controles para alelos e genótipos do loco MTHFR 677.....	36
Tabela 5: Distribuição das freqüências genotípica e alélica de MTHFR A1298C entre controles e casos.....	37
Tabela 6: Odds ratio de casos e controles para alelos e genótipos do loco MTHFR 1298.....	38
Tabela 7: Odds ratio das combinações genotípicas dos locos MTHFR C677T e MTHFR A1298C de casos e controles. ....	39
Tabela 8: Odds ratio das combinações genotípicas de risco dos locos MTHFR C677T e MTHFR A1298C de casos e controles. ....	39
Tabela 9: Odds ratio das combinações genotípicas de proteção dos locos MTHFR C677T e MTHFR A1298C de casos e controles.....	39
Tabela 10: Distribuição de freqüências genotípicas e alélicas do SNP MTHFR C677T em diversas populações, incluindo a população do presente estudo.....	41
Tabela 11: Distribuição de freqüências genotípicas e alélicas do SNP MTHFR A1298C em diversas populações, incluindo a população do presente estudo.....	42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2008 e 2009, exceto pele não melanoma, na população brasileira.. ..... 13
- Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama feminina por 100.000 mulheres, estimadas para os anos 2008 e 2009, segundo a Unidade da Federação.. ..... 15
- Figura 3: Composição da susceptibilidade ao câncer de mama. Câncer de mama familiar (à esquerda) contribui com apenas 5 a 10% do total de câncer de mama (à direita). Os genes envolvidos no câncer de mama familiar (*BRCA1* e *BRCA2*) perfazem aproximadamente 30% do total de câncer familiar. A maioria das variantes genéticas que contribuem para o desenvolvimento de câncer de mama esporádico são desconhecidos..... 18
- Figura 4: Cromossomo 1 humano, com indicação da localização do gene *MTHFR*..... 20
- Figura 5: Resumo da via metabólica do ácido fólico e o papel de metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), S-adenosilmetionina (*SAM*), S-adenosilhomocisteína (*SAH*), ácido dihidrotetrafolico (*DHF*) e ácido tetrahidrofólico (*THF*). ..... 22
- Figura 6: Imagem de eletroforese em gel de agarose 4,5% corado com brometo de etídeo, visualizado por transiluminador UV. As bandas são produtos de PCR da região *MTHFR* 677, após digestão com a enzima *HinfI*. Raia 1: marcador de peso molecular Low Molecular Weigh NEB™. Raia 2: genótipo CC, produto de PCR não digerido, apresenta uma banda de 198 pares de bases (pb). Raia 3: genótipo CT, apresenta duas bandas, de 198 e 175pb, produto de PCR parcialmente digerido, indicando presença do SNP em apenas um dos cromossomos do indivíduo. Raia 4: genótipo TT, representado pela presença de apenas uma banda de 175pb, produto de PCR digerido, indicando presença do SNP nos dois cromossomos. Os

fragmentos de 23pb nos indivíduos CT e TT não são visíveis nesta foto. ....29

Figura 7: Imagem de eletroforese em gel de agarose 4,5% corado com brometo de etídeo, visualizado por transiluminador UV. As bandas são produtos de PCR da região *MTHFR* 1298, após digestão com a enzima *MbolI*. Raia 1: Genótipo CC, uma banda de 100pb, resultado da digestão do produto de PCR pela enzima. Raia 2: genótipo AA, produto de PCR digerido, apresentando uma banda de 72pb. Raia 3: genótipo AC, apresenta duas bandas, de 100 e 72pb. Nesta imagem não são visíveis as bandas de 28pb resultantes da digestão. Raia 4: marcador de peso molecular NEB™ Low Molecular Weight.....30

Figura 8: Distribuição percentual de frequência de casos e controles por faixa etária. ....32

Figura 9: Distribuição percentual de frequência de casos e controles por etnia. ....33

Figura 10: Distribuição percentual de frequência de casos e controles por idade da menarca.....33

Figura 11: Distribuição percentual de fumantes e não fumantes entre casos e controles.....34

Figura 12: Distribuição percentual de casos e controles de acordo com o número de filhos.....34

Figura 13: Distribuição percentual de usuárias de anticoncepcional oral entre casos e controles. ....35

Figura 14: Distribuição percentual de utilização de terapia de reposição hormonal entre casos e controles. ....35

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 Epidemiologia do câncer	12
1.2 Câncer de mama	14
1.2.1 PATOLOGIA	14
1.2.2 EPIDEMIOLOGIA	14
1.2.3 FATORES DE RISCO	16
1.2.4 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA	17
1.3 Polimorfismos de DNA	18
1.4 O Gene e a Proteína Metilenotetrahydrofolato Redutase	20
1.4.1 POLIMORFISMOS NO <i>MTHFR</i>	23
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
4.1 Aspectos gerais	26
4.2 Obtenção das amostras	26
4.3 Separação e conservação das amostras	26
4.4 Extração e quantificação de DNA	27
4.5 Genotipagem	27
4.5.1 PCR E DIGESTÃO DO LOCO <i>MTHFR</i> 677	28
4.5.2 PCR E DIGESTÃO DO LOCO <i>MTHFR</i> 1298	30
4.6 Análise e tratamento dos dados	31
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
5.1 Caracterização da amostra	32
5.2 Análise do Polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	35
5.3 Análise do Polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C	37
5.4 Análise da combinação genotípica dos dois SNPs do gene <i>MTHFR</i>	38
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
6.1 Frequências genotípicas e alélicas	40
6.2 Análise de associação	44
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO A – PARECER CONEP</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO B - QUESTIONÁRIO</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>61</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A Genética Humana vem adquirindo uma importância crescente na sociedade e nos sistemas de Saúde Pública em face ao desenvolvimento científico e tecnológico gerado nos últimos anos. Esta área apresenta interface com diversas especialidades clínicas e ciências básicas, especialmente a Oncologia, fornecendo subsídios para a compreensão da patogênese e predisposição ao desenvolvimento tumoral.

O câncer se caracteriza pelo descontrole da divisão celular. A célula neoplásica é definida por duas propriedades hereditárias: ela e sua descendência reproduzem-se desobedecendo aos controles normais da divisão celular, invadem e colonizam regiões normalmente destinadas a outras células. Uma célula anormal isolada, que não se prolifera além das suas vizinhanças normais não causa dano significativo. Se, entretanto, sua proliferação estiver fora de controle, ela dará início a um tumor, ou neoplasia, uma massa compacta de células anormais continuamente em crescimento. Todavia, desde que as células neoplásicas permaneçam agregadas formando uma massa única, o tumor é dito ser benigno. Um tumor é considerado um câncer apenas se for maligno, isto é, somente se suas células tiverem adquirido a capacidade de invadir outros tecidos (GRIFFITHS *et al.*, 2006; ALBERTS *et al.*, 2004).

As células cancerosas apresentam, no mínimo, seis características em comum: (1) continuam a crescer e a se dividir em situações nas quais as células normais não o fariam, ou seja, elas crescem mesmo sem receber um sinal químico de crescimento; (2) continuarão a crescer mesmo que as células vizinhas enviem sinais para interromper o crescimento. Por exemplo, células normais param de crescer quando comprimidas por outras células. De alguma forma, os tumores conseguem evitar isso; (3) conseguem se manter ativas e evitar o sinal de apoptose que geralmente ocorre quando há lesão no DNA (BEAUSEJOUR & CAMPISI, 2006); (4) são capazes de cooptar o sistema vascular do organismo, causando o crescimento de novos vasos sanguíneos para fornecer nutrientes às células cancerosas; (5) são essencialmente imortais: as células normais podem dividir-se apenas em um número limitado de vezes, porém, as células cancerosas e os tumores não dependem desse

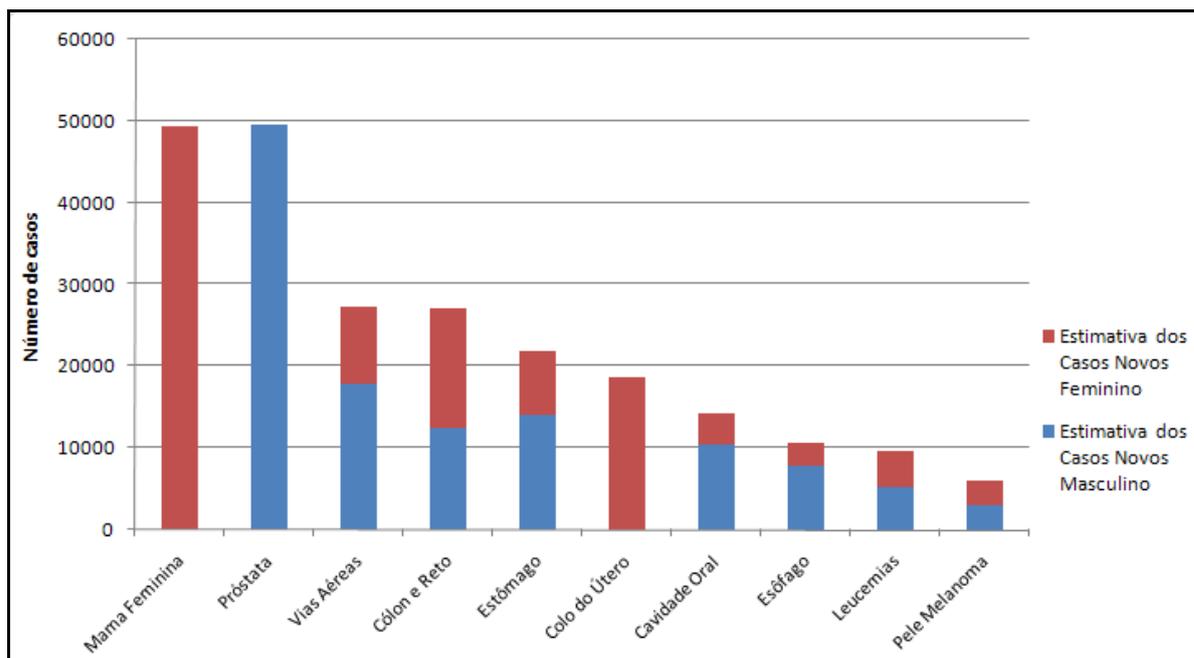
limite; (6) a mais letal das características: possuem capacidade de se desprender, chegar a outras partes do corpo e iniciar novos focos tumorais (CAMPBELL & FARRELL, 2007).

## 1.1 Epidemiologia do câncer

O câncer é uma das principais preocupações mundiais em Saúde Pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é a principal causa de morte no mundo todo e a estimativa é de que o câncer continue vitimando e que morram 9 milhões de pessoas em 2015 e 11,4 milhões em 2030 (OMS, 2008).

Para o ano de 2008, a estimativa é de que sejam diagnosticados 1.437.180 novos casos de câncer na população dos Estados Unidos. Esta estimativa não inclui carcinoma *in situ* (cânceres não invasivos), nem câncer de pele, cuja estimativa de novos casos é por volta de 1 milhão. A expectativa de morte por câncer, da população norte-americana, em 2008, é de 565.650 pessoas. Nesta população, o câncer é responsável por 1 em cada 4 mortes (AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS, 2008).

No Brasil, a estimativa para os anos de 2008 e 2009 é de 466.730 novos casos, sendo os tipos mais incidentes, à exceção de câncer de pele não melanoma, os de próstata (49 mil) e pulmão (18 mil) no sexo masculino e mama (49 mil) e colo de útero (19 mil) no sexo feminino (figura 1, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2008).



**Figura 1: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2008 e 2009, exceto pele não melanoma, na população brasileira.**  
**Fonte: INCA, 2008.**

Por ser uma doença que afeta uma população mais idosa, as curvas de crescimento de mortalidade por câncer no Brasil são compatíveis com as tendências mundiais. As principais causas para o crescimento da mortalidade por câncer verificadas nos últimos 20 anos foram: (1) a melhora das condições de saneamento básico e das condições de saúde do país, ocorridas ao longo dos anos, que reduziram as mortes por doenças infecto-parasitárias e elevaram a expectativa de vida dos brasileiros; (2) o envelhecimento da população, que propiciou um aumento natural da mortalidade por doenças crônicas, entre as quais, as neoplasias; (3) as modificações de comportamento verificadas na sociedade em função das exigências da vida moderna e a adoção de hábitos de risco, tais como sedentarismo e alimentação desequilibrada. As maiores taxas de mortalidade estão nas regiões mais desenvolvidas do país, Sul e Sudeste (INCA, 2008), uma vez que são regiões com maior oferta de serviços de saúde públicos e privados disponíveis para a população (ANDERSON *et al.*, 2006).

## 1.2 Câncer de mama

### 1.2.1 PATOLOGIA

O fator mais importante no prognóstico do câncer de mama é descobrir se ele é invasivo ou não-invasivo.

O câncer de mama não-invasivo, ou *in situ*, se confina aos ductos ou lóbulos e não se espalha para os tecidos adjacentes da mama ou de outras partes do corpo. Já o câncer invasivo (ou infiltrante) começa a ultrapassar os limites do tecido mamário e invade áreas próximas. Eles podem se espalhar para outras partes do corpo através da corrente sanguínea e do sistema linfático .

Podemos dividir o carcinoma mamário em quatro categorias:

- a) Carcinoma ductal *in situ*: é o mais freqüente dos cânceres de mama não invasivos e é considerado o primeiro estágio do câncer. Representa um crescimento descontrolado de células que estão confinadas no ducto mamário.
- b) Carcinoma lobular *in situ*: é uma área de crescimento celular anormal, cujo início se dá nos lóbulos mamários. Não é um câncer propriamente dito, mas aumenta a chance de que o portador desenvolva um câncer no futuro.
- c) Carcinoma ductal invasivo: é o tipo mais comum de câncer de mama. Cerca de 80% dos cânceres são dessa categoria.
- d) Carcinoma lobular invasivo: é o segundo tipo mais comum de câncer de mama. Ele invade os tecidos adjacentes à glândula. Com o tempo, pode se espalhar para os linfonodos e possivelmente para outras áreas do corpo (BREASTCANCER.ORG, 2008).

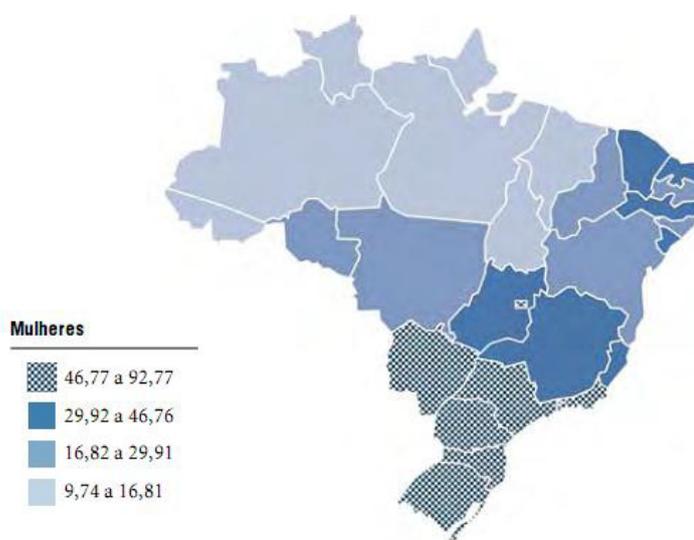
### 1.2.2 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e é o mais freqüente em mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos novos casos de cân-

cer são de mama (INCA, 2008). Ele representa uma das principais causas de morte em mulheres nos países ocidentais. Mais de 1,1 milhão de novos casos são diagnosticados anualmente, o que representa 10% de todos os novos casos de câncer. As mortes causadas por câncer de mama, mais de 410 mil anualmente, representam aproximadamente 1,6% de mortes de mulheres no mundo (BREAST HEALTH GLOBAL INITIATIVE - BHGI, 2008; ANDERSON *et al.*, 2006). A Sociedade Americana de Cancerologia indica que uma em cada 8 mulheres americanas tem a probabilidade de desenvolver câncer de mama durante a sua vida.

Nos anos 80, a incidência de câncer de mama nos Estados Unidos aumentou repentinamente. Possivelmente, não representa um aumento real, devido ao uso sistemático da mamografia, que possibilitou identificar com mais facilidade a doença. Nos últimos anos a taxa de mortalidade por esse tipo de câncer teve uma queda devido à detecção precoce e à redução dos tratamentos de reposição hormonal (ACS, 2008).

Dos 466.730 novos casos de câncer previstos para 2008 e 2009 no Brasil, o câncer de mama seria o mais incidente na população feminina, estimando-se 49.400 novos casos (figura 2). Segundo estatísticas, a incidência desta enfermidade está em torno de 51 casos a cada 100.000 mulheres e a sobrevivência média após cinco anos é de 61%, na população mundial (INCA, 2008).



**Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama feminina por 100.000 mulheres, estimadas para os anos 2008 e 2009, segundo a Unidade da Federação. Fonte: INCA, 2008.**

No Estado de Santa Catarina a incidência do câncer de mama é maior, 52,03/100.000 (1610 novos casos/ano). Considerando-se somente a capital do Estado, Florianópolis, a taxa de incidência aumenta para 62,45/100.000 (tabela 1), com um número aproximado de 130 novos casos/ano e 40 óbitos/ano (INCA, 2008). Sendo assim, a caracterização dos fatores de risco presentes nesta população é fundamental para o delineamento de estratégias de prevenção direcionadas a ela.

**Tabela 1: Estimativas para o ano 2008, no Estado de Santa Catarina e em Florianópolis, das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.**

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS			
	ESTADO		CAPITAL	
	Casos	Taxa bruta	Casos	Taxa bruta
Mama Feminina	1.610	52,03	130	62,45
Colo de Útero	510	16,38	40	19,18
Cólon e Reto	510	16,37	50	26,19
Traquéia, Brônquio e Pulmão	360	11,84	30	14,16
Estômago	280	9,12	20	9,65
Leucemias	170	5,53	*	4,70
Cavidade Oral	80	2,63	*	5,59
Pele Melanoma	250	8,08	20	7,94
Esôfago	110	3,32	*	0,96
Outras Localizações	1.890	61,37	*	0,00
Subtotal	5.770	187,36	320	158,08
Pele não Melanoma	2.680	86,98	350	171,42
Todas as Neoplasias	8.450	274,37	670	330,98

\*Menor que 15 casos.

Fonte: INCA, 2008.

### 1.2.3 FATORES DE RISCO

Estudos epidemiológicos citam fatores de risco endógenos e exógenos associados ao desenvolvimento de câncer de mama: sexo (predominância do feminino), país de nascimento, menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez tardia (ou ausência de gestações), utilização de hormônios exógenos (anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal), não amamentação, tabagismo, consumo de carne vermelha e industrializada (bacon, hambúrguer, salsicha), obesidade e história

familiar de câncer (ACS, 2008; BHGI, 2008; GERGER *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 1999).

Os fatores ambientais são responsáveis pela maioria dos casos de câncer e a lesão do DNA está consistentemente associada ao risco do desenvolvimento de neoplasias (CEBRIANT *et al.*, 2006; CRESPI & SUMMERS, 2005; SMITH *et al.*, 2003), sendo que 5 a 10% dos tumores de mama são hereditários e cerca de 30% de mulheres jovens que desenvolvem câncer de mama devem apresentar um padrão genético de predisposição à doença (DUFLOTH *et al.*, 2005).

#### 1.2.4 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA

Nas últimas décadas, diversas evidências indicaram a natureza genética do câncer – ou seja, o resultado do acúmulo de mutações (herdadas ou adquiridas) no genoma. A maioria das neoplasias resulta da interação de fatores genéticos e ambientais. A predisposição genética é responsável por aproximadamente 5% de todos os casos, os demais são atribuídos a causas externas, ou seja, fatores ambientais que atuam em conjunto com a susceptibilidade genética e a adquirida (MENKO *et al.*, 2007). O estabelecimento de políticas públicas para a prevenção do câncer deve considerar a variabilidade individual na susceptibilidade ao câncer, que é decorrente de fatores genéticos, étnicos, nutricionais e ambientais.

A etiologia do câncer de mama é extremamente complexa. Estudos de ligação gênica em famílias afetadas resultaram na identificação de dois genes de alta penetrância, *BRCA1* e *BRCA2* (MIKI *et al.*, 2000; WOOSTER *et al.*, 1995). Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* aumentam o risco de câncer de mama e ovário e são responsáveis por cerca de 30% dos casos hereditários (figura 3). No entanto, apenas 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama são decorrentes de mutações germinais nestes genes (PHAROAH *et al.*, 2007; LANGSENLEHNER *et al.*, 2003; KUSCHEL *et al.*, 2002; DUNNING *et al.*, 1999).

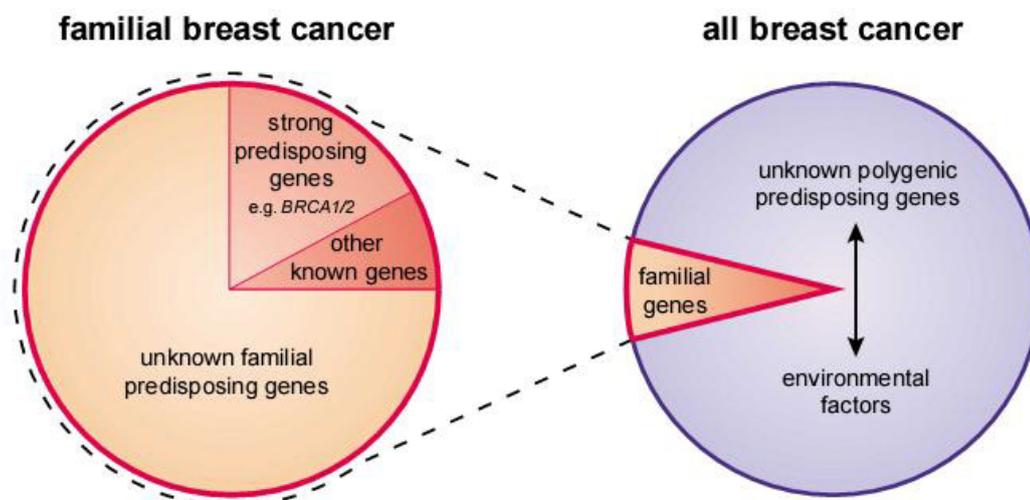


Figura 3: Composição da susceptibilidade ao câncer de mama. Câncer de mama familiar (à esquerda) contribui com apenas 5 a 10% do total de câncer de mama (à direita). Os genes envolvidos no câncer de mama familiar (BRCA1 e BRCA2) perfazem aproximadamente 30% do total de câncer familiar. A maioria das variantes genéticas que contribuem para o desenvolvimento de câncer de mama esporádico são desconhecidos.

Fonte: BALMAIN *et al.*, 2003.

Sendo assim, outros genes que causam susceptibilidade ao câncer de mama (de baixa penetrância) estão envolvidos (GERGER *et al.*, 2007). A investigação destes genes é de extrema importância, pois codificam proteínas que participam em uma grande variedade de processos que atuam de forma importante na carcinogênese, tais como a metabolização de xenobióticos, a entrada de hormônios nas células e o reparo e metilação do material genômico. Tais genes se apresentam com variações em sua constituição, isto é, apresentam alelos, muitas vezes polimorfos.

### 1.3 Polimorfismos de DNA

Polimorfismo é definido como a presença da variabilidade genética de um determinado loco que ocorre em uma população, em que os alelos apresentem frequências entre 1 e 99%. Eles podem acarretar aumento, diminuição ou perda de função das enzimas, e conseqüentemente, podem ser a causa direta de uma anormalidade fenotípica, resultar em um aumento na susceptibilidade a uma doença e também podem ser silenciosos.

Os polimorfismos de DNA podem ser de tamanho, como no caso dos satélites, minissatélites e microssatélites, ou podem ser de seqüência, como por exemplo, as inserções e deleções de material genético e os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), que é o tipo de polimorfismo analisado nesse trabalho, que representa mudança de uma única base por outra. Pode ser uma transição, que se caracteriza por uma substituição de uma pirimidina (C ou T) por outra pirimidina ou de uma purina (A ou G) por outra purina; pode ser transversão, que é a substituição de uma pirimidina por uma purina ou vice-versa (STRACHAN & READ, 2002).

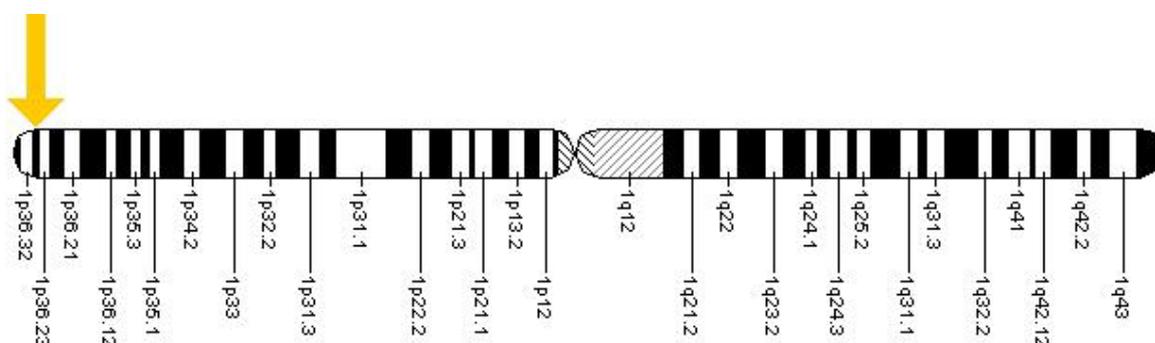
O estudo destas variações e seu papel na susceptibilidade dos indivíduos ao câncer de mama têm se tornado cada vez mais importante quando associados a outros riscos ditos clássicos. Este tipo de associação evidencia se os locos estudados, ou um loco vizinho, estão relacionados à susceptibilidade à doença (PHAROAH *et al.*, 2007). Este tipo de estudo constitui o que se chama atualmente de Epidemiologia Molecular.

A manifestação e o comportamento das células são determinados pelos genes expressos por elas. O comportamento anormal das células cancerosas pode, então, ser explicado por modificações no conjunto de genes que estão ativos nestas células. A ativação ou inativação de genes pode ser uma característica herdada, assim como são os próprios genes. O que se herda de informação em nível de expressão gênica refere-se à epigenética, que é o estudo de características herdáveis do genitor para a prole que não resultam de uma mutação no DNA (PASTERNAK, 2007), em oposição à genética, que se refere à informação ao nível de seqüência de nucleotídeos. A metilação enzimática do carbono 5' de resíduos de citosina pode afetar a herança epigenética pela alteração da expressão de genes e pela transmissão de padrões de metilação de DNA através da divisão celular. Por isso, a metilação do DNA pode contribuir para a mudança de expressão gênica, que pode provocar o aparecimento de um tumor (JONES & LAIRD, 1999).

Polimorfismos em genes que codificam enzimas das vias de metilação, como por exemplo, a metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), podem alterar a regulação gênica, o que contribuiria para aumentar o risco do desenvolvimento de câncer (HUANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007; LANGSENLEHNER *et al.*, 2003; YI *et al.*, 2002).

## 1.4 O Gene e a Proteína Metilenotetrahidrofolato Redutase

O gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3, figura 4), possui 20.329 pares de bases, 12 exons e 11 introns e produz um mRNA de 7.105 pares de bases. A enzima codificada por este gene, a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), é formada por 656 aminoácidos (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2008).



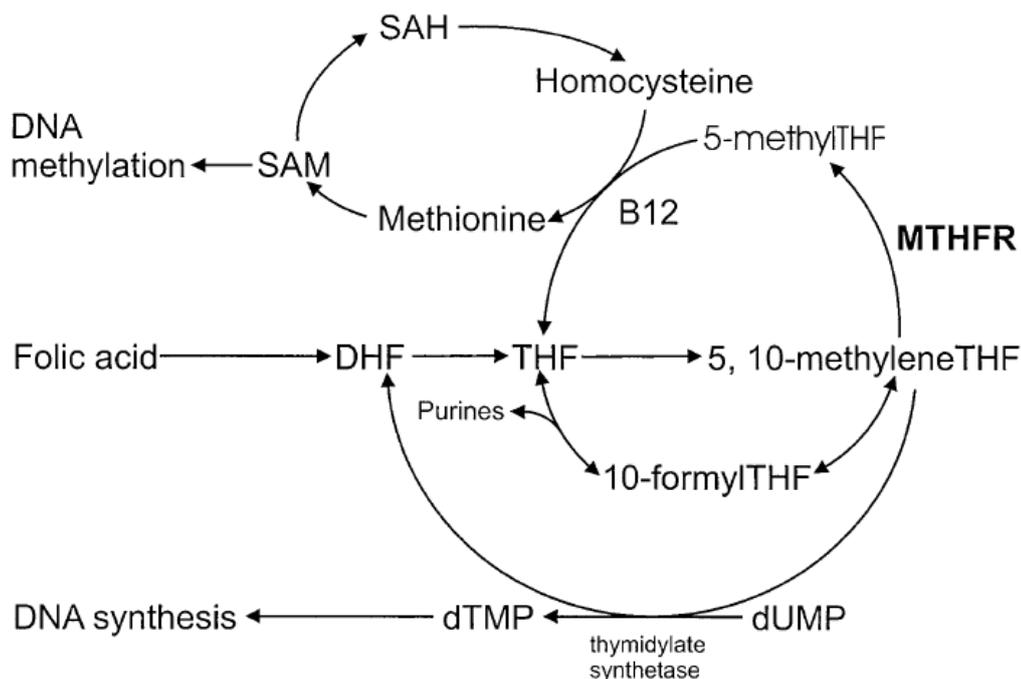
**Figura 4: Cromossomo 1 humano, com indicação da localização do gene *MTHFR*.**  
 Fonte: GENETICS HOME REFERENCE, 2008.

A MTHFR participa da homeostase do folato e da homocisteína, sendo, portanto, peça-chave da síntese de purinas e do processo de síntese e metilação do DNA. A metilação do DNA genômico está diretamente correlacionada com o nível de folato e inversamente com o nível de homocisteína plasmática (CHENG *et al.*, 2008; MACIS *et al.*, 2007; DURGA *et al.*, 2006; SAZCI *et al.*, 2005; SHRUBSOLE *et al.*, 2004; SHRUBSOLE *et al.*, 2001; WEISBERG *et al.*, 1998). É uma característica epigenética essencial do DNA, regula a expressão gênica e a integridade genômica durante a diferenciação celular e é catalisada por metiltransferases, que utilizam S-adenosil-L-metionina como doador universal de grupo metil (KOTSOPOULOS *et al.*, 2008; QUINLIVAN *et al.*, 2005; SAZCI *et al.*, 2005; ERGUL *et al.*, 2003).

O metabolismo da homocisteína começa com a ingestão de ácido fólico pela dieta. Este é rapidamente reduzido para sua forma ativa, tetrahydrofolato, que se torna 5,10-metilenotetrahydrofolato pela enzima metilenotetrahydrofolato redutase, que tem um papel crucial nessa via metabólica. Esse substrato é vital para o metabolismo de ácidos nucléicos e aminoácidos, incluindo aqueles necessários para síntese

de nucleotídeos e, conseqüentemente, para a divisão celular. Os produtos dessa reação são grupos metil utilizados para síntese de metionina, necessária para metilação do DNA. No segundo passo dessa via metabólica, a enzima metionina sintetase (MTR) catalisa a remetilação da homocisteína para metionina, necessária para produção de S-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de metil. A vitamina B12 age como co-fator para metilação (figura 5). Ela se oxida e a enzima MTR é inativada. A regeneração da metionina sintetase requer a participação de outra enzima, metionina sintetase redutase (MTRR) (BISELLI *et al.*, 2008; BRANDALIZE *et al.*, 2007; ZINTZARAS, 2007; SANTOS *et al.*, 2006; SAZCI *et al.*, 2006; FRISO *et al.*, 2002; UELAND *et al.*, 2001; SKIBOLA *et al.*, 1999).

Homocisteína é um aminoácido sulfurado que não pode ser obtido pela dieta. Ele é produzido no ciclo de metilação, que é crítico não apenas para sua formação, como também para sua remoção. Toda reação de metilação que utilize S-adenosilmetionina (SAM) como doador de metil gera S-adenosilhomocisteína (SAH). Dentro das células, SAH é rapidamente convertida para homocisteína pela enzima SAH-hidrolase. Apesar de essa reação ser irreversível, o fluxo metabólico em condições fisiológicas normais prossegue na direção hidrolítica, quando a homocisteína é rapidamente removida e sua concentração permanece baixa. Entretanto, quando a concentração de homocisteína aumenta, a reação da SAH-hidrolase vai a favor da formação de SAH. Isto tem relevância bioquímica muito grande porque foi mostrado que a SAH é um potente inibidor de reações de metilação SAM-dependentes (BOT-TIGLIERI, 2005; SELHUB, 1999).



**Figura 5: Resumo da via metabólica do ácido fólico e o papel de metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), ácido dihidrotetrafolico (DHF) e ácido tetrahidrofólico (THF).**  
 Fonte: SKIBOLA *et al.*, 1999.

A metilação anormal do DNA genômico geralmente é associada a diferentes doenças e ao desenvolvimento de câncer (CHOU *et al.*, 2006; JONES & LAIRD, 1999; FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983). O carcinoma mamário pode ser iniciado através da ativação de proto-oncogenes por hipometilação das suas regiões promotoras, por inativação de genes supressores de tumor por hipermetilação ou ainda por alteração no padrão de metilação do gene do receptor de estrógeno (SHARP *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2008; SEMENZA *et al.*, 2003; SHARP *et al.*, 2002; MIKI *et al.*, 2000; ROHAN *et al.*, 2000; LAIRD & JAENISCH, 1994).

Além disso, o folato também é necessário para a transferência de grupos metil na síntese *de novo* de nucleotídeos (MAO *et al.*, 2008). Quando se tem baixo nível citosólico de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilenotetrahidrofolato (o cofator para síntese de timidilatos), a síntese de timidilatos é diminuída, aumentando a razão dUMP/dTMP intracelular e a incorporação errada de dUTP no DNA pela DNA polimerase. Quando essa incorporação errônea é detectada, a enzima uracil-DNA glicosilase gera uma quebra transitória no DNA para que o erro seja reparado. O reparo induzido pela uracil-DNA glicosilase pode causar mutações pontuais e quebras cromossômicas e é a provável

causa de deleções e duplicações genéticas (ZINTZARAS *et al.*, 2008; BOCCIA *et al.*, 2007; MACIS *et al.*, 2007; BLOUNT *et al.*, 1997).

A potencial influência da MTHFR na metilação do DNA e na disponibilidade de uridilatos e timidilatos para síntese e reparo de DNA faz do *MTHFR* um gene candidato potencial à predisposição ao câncer (KOTSOPOULOS *et al.*, 2008; BOCCIA *et al.*, 2007; SIRAJ *et al.*, 2007; CHOU *et al.*, 2006; ERGUL *et al.*, 2003; MARCHAND *et al.*, 2002).

#### 1.4.1 POLIMORFISMOS NO *MTHFR*

Frosst e seus colaboradores, em 1995, identificaram a transição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677 do gene *MTHFR*, que converte uma alanina em uma valina no códon 222 e é responsável pela síntese de uma forma termolábil da enzima (NCBI, 2008), o que acarreta a perda parcial da atividade enzimática (SELZER *et al.*, 2003; FRISO *et al.*, 2002).

VAN DER PUT *et al.* (1998), identificaram outro polimorfismo do gene *MTHFR*: a transversão de uma adenina para uma citosina na posição 1298, que resulta na substituição de um ácido glutâmico por uma alanina no códon 429 (NCBI, 2008).

A transição C677T (dbSNP rs1801133) ocorre no domínio catalítico da enzima e provoca a diminuição da atividade enzimática para apenas 35% da atividade normal em indivíduos com o genótipo TT (KARA *et al.*, 2003; WEISBERG *et al.*, 1998). Por sua vez, a mutação A1298C (dbSNP rs1801131) localiza-se no domínio regulatório e também resulta na diminuição da atividade enzimática, mais pronunciadamente quando em homozigose do que em heterozigose, quando apresenta apenas em torno de 60% da atividade do fenótipo selvagem (WEISBERG *et al.*, 1998). Nem o estado homozigoto nem o estado heterozigoto da mutação no loco 1298 são associados com maior nível de homocisteína no plasma, nem com menor concentração de folato, o que é evidente na homozigose de 677T (NCBI, 2008). Entretanto, VAN DER PUT *et al.* (1998) descobriram que a heterozigose combinada dos dois polimorfismos está associada à redução da atividade da MTHFR, ao aumento do nível de homocisteína e a menores concentrações de folato no plasma.

## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores realizados no nosso país, especificamente na população do Rio de Janeiro (AMORIM *et al.*, 2002) e do Paraná (MACIEL, 2007; TORRESAN, 2006), afirmam a importância das diferenças étnicas na distribuição de polimorfismos de genes de baixa penetrância, como por exemplo, os *GSTs*, *CYPs*, *COMT* e *MTHFR*, as quais podem influenciar a susceptibilidade genética ao CAMA. A mistura étnica ocorrida durante a formação da população brasileira, principalmente entre os grupos parentais Ameríndio, Africano e Europeu, ressalta a sua singularidade em todo o mundo com relação ao delineamento de estudos de Epidemiologia Molecular.

De acordo com a OMS, os estudos populacionais são de grande importância para a identificação de fatores etiológicos e populações susceptíveis ao desenvolvimento tumoral, subsidiando o estabelecimento de estratégias de prevenção mais eficientes.

Este estudo caso-controle colabora com a pesquisa por marcadores moleculares do CAMA, para facilitar o diagnóstico e melhorar o prognóstico da doença.

Muitos esforços para a melhoria no controle do câncer de mama, tanto no âmbito preventivo e diagnóstico como no terapêutico e cirúrgico têm sido realizado, mas a luta contra o câncer de mama ainda necessita de maior conhecimento sobre a etiologia e fatores de risco da doença. A busca de novas ferramentas que auxiliem no desenvolvimento dessas áreas deve ser considerada essencial.

Assim, marcadores genéticos como SNPs merecem atenção como ferramentas mais aprimoradas para diagnóstico, prognóstico e detecção de fatores de risco do câncer de mama, podendo auxiliar no esclarecimento do caráter multifatorial da doença e propiciar a melhoria da qualidade de vida de muitas mulheres, ajudando na prevenção da doença.

Levando em consideração a importância dos mecanismos de metilação de DNA e conseqüente regulação gênica para manutenção da integridade genômica, é evidente o possível envolvimento do gene *MTHFR* com o desenvolvimento de vários tipos de câncer, inclusive o câncer de mama. Sendo assim, é relevante a investigação de polimorfismos que possam alterar a integridade e expressão desse gene, podendo vir a ser utilizados como marcadores genéticos para o CAMA.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a associação de dois polimorfismos do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) e o câncer de mama (CAMA) através de um estudo caso-controle, visando obter parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população de Santa Catarina.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Ampliar o número de amostras já existentes no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), através da coleta de material biológico e informações epidemiológicas de novos casos e controles.
2. Otimizar as técnicas necessárias para a genotipagem dos SNPs C677T e A1298C do gene *MTHFR*.
3. Identificar os alelos dos SNPs C677T e A1298C do gene *MTHFR* e estimar suas frequências nas amostras de casos e controles.
4. Tabular os resultados e realizar análises estatísticas, tais como a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.
5. Realizar um estudo de associação caso-controle no intuito de avaliar o papel dos diferentes alelos acima citados na susceptibilidade ao CAMA.
6. Comparar as frequências alélicas e genotípicas observadas na população estudada com demais populações verificadas na literatura.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos gerais**

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, coordenado pela Dra. Ilíada Rainha de Souza, intitulado “Câncer de mama: Avaliação de Parâmetros Informativos e Prognósticos na População de Santa Catarina”, aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina, registrado sob número 191/2003 em 24 de novembro de 2003, e pelo CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), sob parecer 027/2006 (ANEXO A).

### **4.2 Obtenção das amostras**

As amostras constituem-se de 125 pacientes com câncer de mama, atendidas pelo Hospital Universitário (HU) - UFSC e pela Maternidade Carmela Dutra, no período de agosto de 2005 a setembro de 2008, e de 117 mulheres sem evidência de carcinoma mamário e nem histórico familiar da doença, que constituem o grupo controle. Os dados familiares e epidemiológicos das pacientes foram obtidos durante entrevista, através de questionários estruturados (ANEXO B). Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos. Após a obtenção do consentimento informado (ANEXO C) e da entrevista, foram coletados cerca de 8 ml de sangue periférico para extração de DNA e análise dos polimorfismos genéticos. Os dados familiares e epidemiológicos dos controles foram obtidos de maneira similar, bem como o consentimento esclarecido e a coleta de sangue periférico, no HU - UFSC e no Hospital Florianópolis.

### **4.3 Separação e conservação das amostras**

As amostras de sangue contendo EDTA foram centrifugadas a 3000 rotações por minutos (rpm), durante 20 minutos, para separação das hemácias, do plasma (que foram estocados) e dos leucócitos (*buffy coat*), os quais foram utilizados para obtenção de DNA genômico.

#### 4.4 Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA genômico foi empregada a técnica descrita por SAMBROOK *et al.* (2001), que utiliza TRITON-X e Proteinase K. Após a extração, os DNAs genômicos passaram a integrar um Banco de DNA, organizado a partir do número de matrícula dos indivíduos. Os dados clínicos e epidemiológicos também foram catalogados.

Após a extração, realizou-se a quantificação do DNA através da absorbância medida em 260nm e 280nm em espectrofotômetro (SAMBROOK *et al.*, 2001). A partir daí as amostras foram diluídas para a concentração de uso de 20µg/ml.

#### 4.5 Genotipagem

Para a pesquisa de polimorfismos genéticos, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP [*Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polimorphism* (Reação em Cadeira da Polimerase – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição)]. Primeiro foram amplificados fragmentos de DNA próximos às posições 677 e 1298 do gene *MTHFR*, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores de seqüência específica para as regiões citadas (tabela 2). Posteriormente, os nucleotídeos variantes nessas regiões foram identificados através da digestão desses fragmentos com as enzimas de restrição *Hinfl* e *MbolI*, para as regiões 677 e 1298, respectivamente. Essas enzimas clivam fragmentos dupla fita de DNA quando identificam sítios de restrição específicos. Os polimorfismos de sítios de restrição (RSPs, do inglês *Restriction Site Polymorphism*) resultam em alelos que possuem ou não um sítio de restrição específico e podem

ser diferenciados pela digestão com a endonuclease de restrição relevante. Os RFLPs resultantes possuem dois alelos correspondendo à presença ou à ausência desse sítio de restrição, gerando fragmentos de restrição cujos tamanhos são característicos dos dois alelos, podendo assim serem identificados (STRACHAN & READ, 2002).

Com isso, foram analisados dois SNPs: a substituição de C por T na posição 677 e de A por C na posição 1298. A variabilidade entre os tamanhos dos fragmentos é visualizada em gel de poliacrilamida ou agarose submetido à eletroforese, que permite identificar se a enzima de restrição clivou o fragmento, possibilitando assim, verificar se os indivíduos possuem as substituições investigadas.

**Tabela 2: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise dos locos 677 e 1298 do gene *MTHFR*.**

		<u>Temperatura de anelamento</u>
<i>MTHFR</i> 677 F	TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA	65° C
<i>MTHFR</i> 677 R	AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG	65° C
<i>MTHFR</i> 1298 F	CAA GGA GGA GCT GCT GAA GA	62° C
<i>MTHFR</i> 1298 R	CCA CTC CAG CAT CAC TCA CT	62° C

Fonte: YI *et al.*, 2002

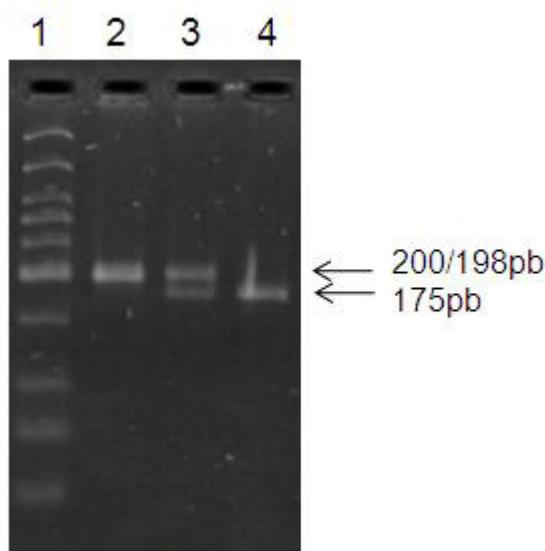
A visualização dos fragmentos em forma de bandas foi realizada em gel de agarose a 4,5% corado com brometo de etídio, onde cada banda corresponde a um grupo de moléculas do mesmo tamanho. As imagens dos géis foram capturadas pelo fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro através do *software* GelCapture™ e analisadas posteriormente.

#### 4.5.1 PCR E DIGESTÃO DO LOCO *MTHFR* 677

As PCRs para o loco 677 realizaram-se com tampão Tris-HCl 10x, pH 8,3; 0,4 µM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 1 nM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 2,4 µg de DNA por microlitro reação.

Os tubos de reação foram levados ao termociclador, onde foi feito o seguinte ciclo de variação de temperatura: 94°C por 2 minutos para ativação da *Taq* polimerase, seguido de 30 ciclos repetidos de amplificação (desnaturação das fitas de DNA a 94°C por 1 minuto; anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 minuto e extensão da nova fita a 72°C por 1 minuto) e extensão final da cadeia a 72°C por 7 minutos (adaptado de YI *et al.*, 2002).

Esta PCR gera um fragmento de DNA de 198 pares de bases (pb). Após submeter este produto à ação da enzima de restrição *Hinfi*, extraída de uma cepa de *E. coli* que carrega o gene clonado *Hinfi* de *Haemophilus influenzae*, cujo sítio de restrição é a seqüência G/ANTC, três situações são possíveis (figura 6): (1) a não digestão do produto de 198pb oriundo da PCR, devido à ausência do sítio de restrição em ambas as fitas de DNA, o que corresponde ao genótipo homozigoto para CC na posição 677; (2) a digestão total do produto, produzindo fragmentos de 175 e 23pb, correspondente aos indivíduos de genótipo homozigoto TT; e (3) fragmentos de 198, 175 e 23pb, por tratar-se de indivíduo heterozigoto CT, onde uma das fitas de DNA apresenta o sítio de restrição e a outra não o apresenta (adaptado de KARA *et al.*, 2003).



**Figura 6:** Imagem de eletroforese em gel de agarose 4,5% corado com brometo de etídeo, visualizado por transiluminador UV. As bandas são produtos de PCR da região *MTHFR* 677, após digestão com a enzima *Hinfi*. Raia 1: marcador de peso molecular Low Molecular Weight NEB™. Raia 2: genótipo CC, produto de PCR não digerido, apresenta uma banda de 198 pares de bases (pb). Raia 3: genótipo CT, apresenta duas bandas, de 198 e 175pb, produto de PCR parcialmente digerido, indicando presença do SNP em apenas um dos cromossomos do indivíduo. Raia 4: genótipo TT, representado pela presença de apenas uma banda de 175pb, produto de PCR digerido, indicando presença do SNP nos dois cromossomos. Os fragmentos de 23pb dos indivíduos CT e TT não são visíveis nesta foto.

#### 4.5.2 PCR E DIGESTÃO DO LOCO *MTHFR* 1298

As PCRs para o loco 1298 realizaram-se com tampão Tris-HCl 10x, pH 8,3; 1,2  $\mu$ M de  $MgCl_2$ ; 0,2  $\mu$ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 0,8 nM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 2,4  $\mu$ g de DNA por microlitro reação

Os tubos de reação para amplificação do loco *MTHFR* 1298 foram colocados no termociclador, onde foi feito o seguinte ciclo de variação de temperatura: 95°C por 5 minutos para ativação da *Taq* polimerase seguido de 40 ciclos repetidos de amplificação (desnaturação das fitas de DNA a 95°C por 1 minuto; anelamento dos iniciadores a 62°C por 1 minuto e extensão da nova fita a 72°C por 1 minuto) e extensão final da cadeia a 72°C por 7 minutos (adaptado de YI, *et al.*, 2002).

O produto gerado por esta PCR é de 128pb. Após a ação da enzima de restrição *MbolI*, extraída de uma cepa de *E. coli* que carrega o gene clonado *MbolI* de *Moraxella bovis*, cujo sítio de restrição é GAAGA(N<sub>8/7</sub>), as seguintes situações são observadas (figura 7): (1) os indivíduos homozigotos AA apresentam três fragmentos, de 28, 28 e 72 pb, por possuírem dois sítios de restrição em ambas as fitas; (2) os indivíduos homozigotos CC apresentam apenas dois fragmentos, de 28 e 100 pb, pois a substituição acarreta a alteração de um dos sítios de restrição reconhecidos pela *MbolI*; e (3) os indivíduos heterozigotos (AC) são identificados pela presença de três fragmentos, de 28, 72 e 100 pb (Adaptado de YI *et al.*, 2002).

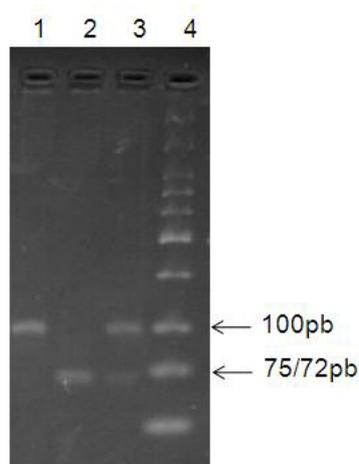


Figura 7: Imagem de eletroforese em gel de agarose 4,5% corado com brometo de etídeo, visualizado por transiluminador UV. As bandas são produtos de PCR da região *MTHFR* 1298, após digestão com a enzima *MbolI*. Raia 1: Genótipo CC, uma banda de 100pb, resultado da digestão do produto de PCR pela enzima. Raia 2: genótipo AA, produto de PCR digerido, apresentando uma banda de 72pb. Raia 3: genótipo AC, apresenta duas bandas, de 100 e 72pb. Nesta imagem não são visíveis as bandas de 28pb resultantes da digestão. Raia 4: marcador de peso molecular NEB™ Low Molecular Weight.

#### 4.6 Análise e tratamento dos dados

As freqüências alélicas e genóticas em cada grupo foram estimadas por contagem direta. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi realizado, para verificação do equilíbrio das distribuições genóticas observadas.

A heterozigosidade esperada, ou seja, a freqüência relativa esperada de indivíduos heterozigotos, foi calculada pelo método de NEI (1987).

Na comparação entre os dois grupos foram aplicados os métodos clássicos de análise epidemiológica para estudos caso-controle (WOOLF, 1955). Para uma estimativa da associação entre os diversos alelos estudados e o câncer de mama, foi calculada uma razão de probabilidade, *odds ratio* (*OR*), utilizando o programa HDS EpiMax Calculator.

O valor de *OR* é muito próximo ao do risco relativo, que exprime quantas vezes o caráter em estudo (no caso, o câncer de mama) é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator (um alelo específico, por exemplo) do que entre aqueles que não possuem o mesmo fator. O valor de *OR* obtém-se construindo uma tabela 2x2 na qual são considerados os casos com o fator (casa A), os casos sem o fator (casa B), os controles com o fator (casa C) e os controles sem o fator (casa D). O valor de *OR* é obtido pela operação matemática  $(A.D)/(B.C)$ . Caso o valor de uma das casas seja zero, usa-se a modificação de Haldane, cuja fórmula é:  $OR = [(A+0,5).(D+0,5)/(B+0,5).(C+0,5)]$ .

Valores de *OR* iguais a ou muito próximos de 1 significam que o fator não deve estar associado à doença em questão. Valores maiores do que 1 indicam maior probabilidade de desenvolver a doença, enquanto que valores menores do que 1 apontam para proteção, conferida pelo fator estudado ou por um outro fator ligado ao primeiro, contra o desenvolvimento da patologia.

O valor de *p* igual a 0,05 foi adotado como limite de significância para todos os testes realizados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra

A amostra constitui-se de 242 mulheres, sendo 125 casos e 117 controles, todas residentes em Santa Catarina, com idade variando entre 29 e 86 anos nos casos e de 21 a 80 anos nos controles. No grupo dos casos, há predominância de pessoas na faixa dos 49 a 55 anos, enquanto que no grupo controle há mais pessoas na faixa de idade de 56 a 62 anos (figura 8).

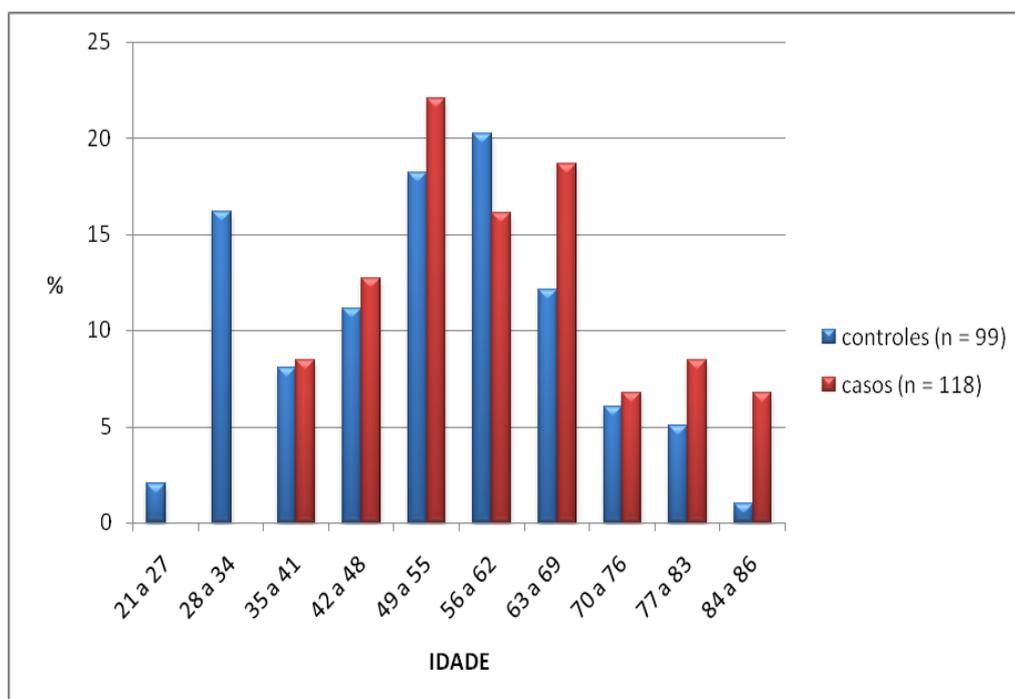
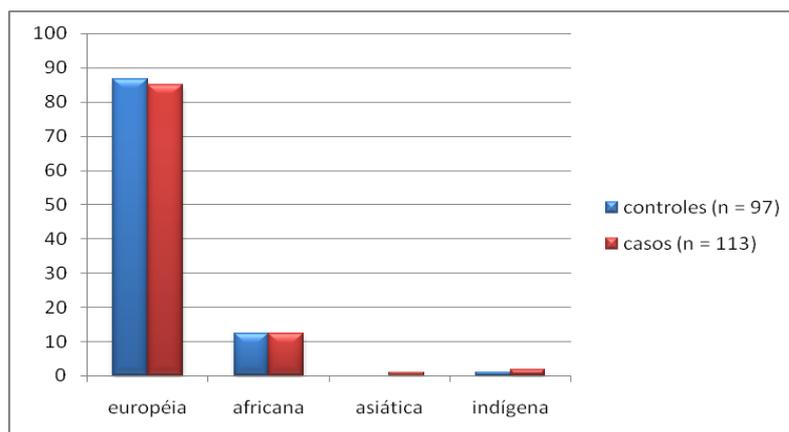


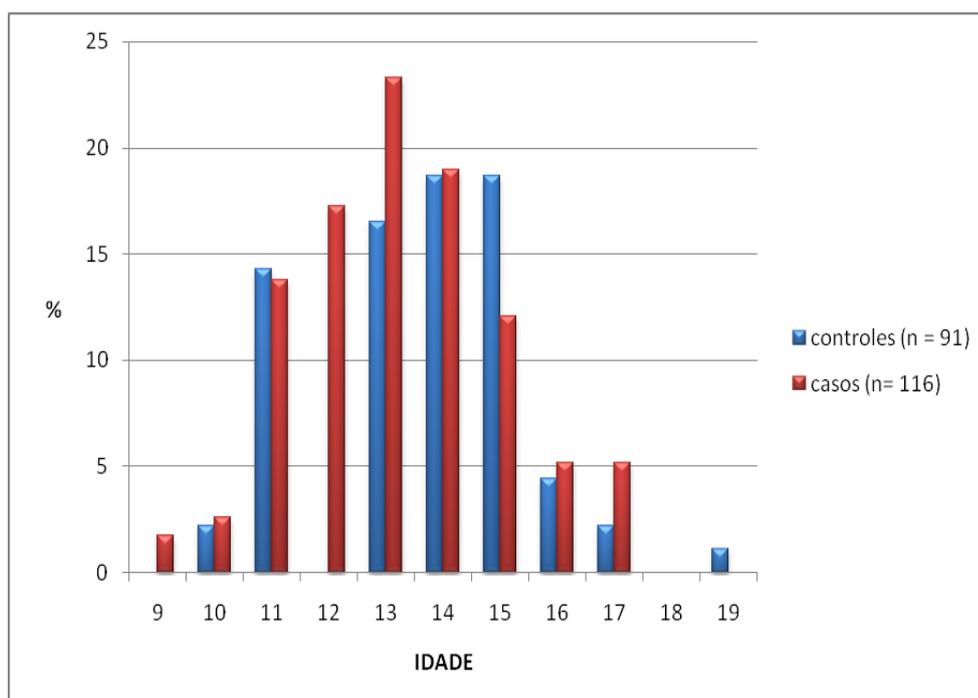
Figura 8: Distribuição percentual de frequência de casos e controles por faixa etária.

A composição étnica dos dois grupos é bastante semelhante, sendo a maioria das mulheres descendentes de europeus (figura 9).



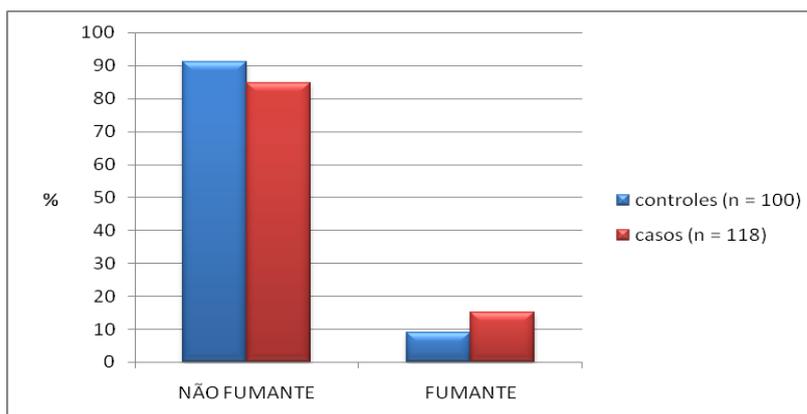
**Figura 9: Distribuição percentual de freqüência de casos e controles por etnia.**

A idade média dos controles no momento de sua primeira menstruação é de 13 anos, com mínimo de 10 e máximo de 19 anos. Nos casos, a média também é de 13 anos, sendo a idade mínima 9 e a máxima, 17 (figura 10).



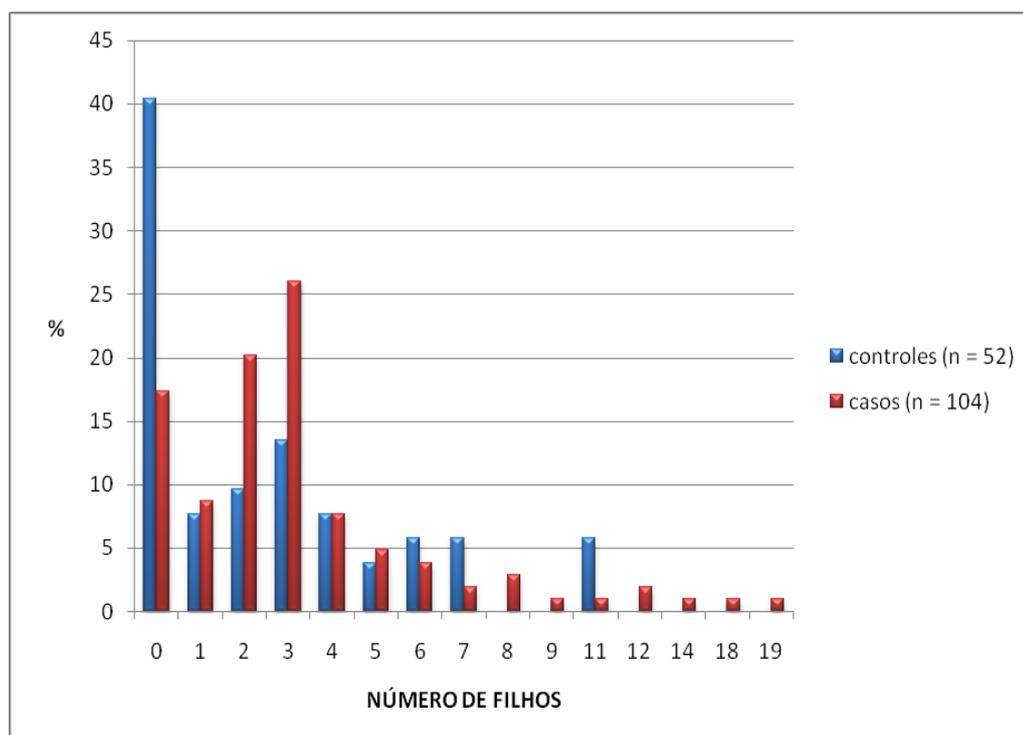
**Figura 10: Distribuição percentual de freqüência de casos e controles por idade da menarca.**

Tanto no grupo controle como no grupo de casos, a maioria das mulheres é não fumante (figura 11). Não foi encontrada diferença significativa entre casos e controles (OR = 0,549, IC 95% = 0,216 - 1,373,  $p = 0,234$ )



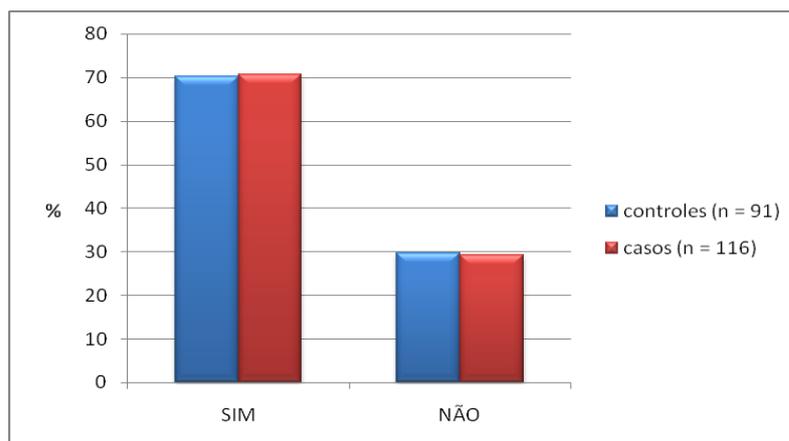
**Figura 11: Distribuição percentual de fumantes e não fumantes entre casos e controles.**

Em relação à paridade, os casos têm mais filhos que os controles (figura 12).



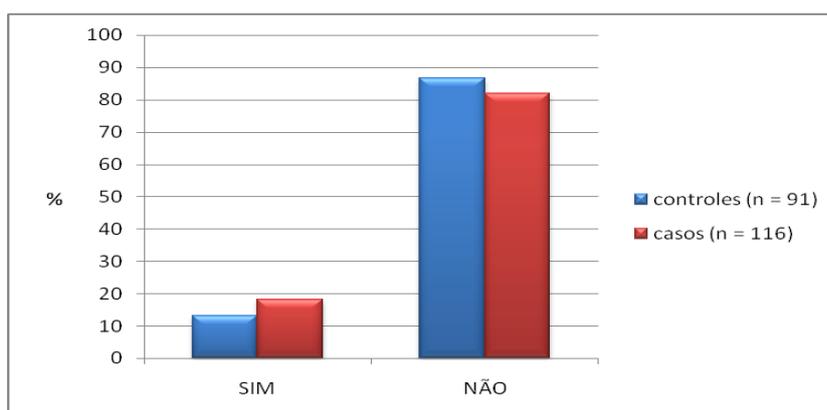
**Figura 12: Distribuição percentual de casos e controles de acordo com o número de filhos.**

Tanto no grupo de casos quanto no de controles, a maioria das mulheres é ou foi usuária de anticoncepcionais orais (figura 13). Também não há diferença estatisticamente significativa para este critério (OR = 0,983, IC 95% = 0,516 - 1,875,  $p = 1,000$ ).



**Figura 13: Distribuição percentual de usuárias de anticoncepcional oral entre casos e controles.**

Nos dois grupos a maioria das mulheres nunca fez terapia de reposição hormonal (figura 14). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (OR = 0,687, IC 95% = 0,297 - 1,576,  $p = 0,443$ ).



**Figura 14: Distribuição percentual de utilização de terapia de reposição hormonal entre casos e controles.**

## 5.2 Análise do Polimorfismo *MTHFR* C677T

No estudo do polimorfismo *MTHFR* C677T, foram genotipados 114 controles e 117 casos. Na tabela 3 encontram-se as frequências genóticas e alélicas observadas para esse loco em controles e casos. Os dois grupos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A heterozigosidade esperada é de 48% para os controles e de 45,5% para os casos.

**Tabela 3: Distribuição das frequências genotípica e alélica de *MTHFR* C677T entre controles e casos.**

	<b>CONTROLES</b> n = 114 (%)	<b>CASOS</b> n = 117 (%)
<b>ALELOS</b>		
C	0,60	0,65
T	0,40	0,35
<b>GENÓTIPOS</b>		
CC	43 (37,7)	47 (40,2)
CT	51 (44,7)	59 (50,4)
TT	20 (17,6)	11 (09,4)
<b>EHW</b>	$\chi^2 = 0,517, p = 0,472$	$\chi^2 = 1,516, p = 0,218$

EHW = Equilíbrio de Hardy-Weiberg;  $p$  = probabilidade.

Não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre casos e controles quando calculados os *odds-ratio* considerando cada alelo e cada genótipo como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (tabela 4). Entretanto, pode-se observar que o genótipo TT apresenta uma diferença no sentido de proteção, tendo valor de *odds ratio* igual a 0,488, embora não seja estatisticamente significativo. Este fato é inesperado, já que apresentando este genótipo, o indivíduo apresenta diminuição da atividade enzimática (NCBI, 2008).

**Tabela 4: Odds ratio de casos e controles para alelos e genótipos do loco *MTHFR* 677.**

	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>ALELOS</b>			
C	1,231	0,829 – 1,828	0,325
T	0,812	0,547 – 1,206	0,325
<b>GENÓTIPOS</b>			
CC vs. TT	1,987	0,793 – 5,041	0,161
CC vs. CT	0,945	0,520 – 1,716	0,955
CT vs. CC	1,058	0,583 – 1,922	0,955
CT vs. TT	2,103	0,858 – 5,217	0,113
TT vs. CC	0,503	0,198 – 1,262	0,161
TT vs. CT	0,475	0,192 – 1,165	0,113
CC vs. CT + TT	1,109	0,631 - 1,949	0,805
CT vs. CC + TT	1,257	0,725 – 2,180	0,463
TT vs. CC + CT	0,488	0,206 – 1,138	0,104
CC + TT vs. CT	0,796	0,459 – 1,380	0,463
CC + CT vs. TT	2,050	0,879 – 4,845	0,104
CT + TT vs. CC	0,902	0,513 – 1,585	0,805

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança;  $p$  = probabilidade.

### 5.3 Análise do Polimorfismo *MTHFR* A1298C

No estudo do polimorfismo *MTHFR* A1298C, foram genotipados 110 controles e 118 casos. Na tabela 5 encontram-se as freqüências genotípicas e alélicas observadas para esse SNP. Os controles encontram-se em EHW, porém o grupo de casos ficou fora do equilíbrio, apresentando excesso de heterozigotos: foi calculada a heterozigosidade esperada e obteve-se o valor de 49,82% para os controles e 49,98% para os casos.

Tabela 5: Distribuição das freqüências genotípica e alélica de *MTHFR* A1298C entre controles e casos.

	CONTROLES n = 111 (%)	CASOS n = 118 (%)
<b>ALELOS</b>		
A	0,47	0,49
C	0,53	0,51
<b>GENÓTIPOS</b>		
AA	25 (22,7)	21 (17,8)
AC	54 (49,1)	73 (61,9)
CC	31 (28,2)	24 (20,3)
<b>EHW</b>	$\chi^2 = 0,032, p = 0,858$	$\chi^2 = 6,692, p = 0,010$

EHW = Equilíbrio de Hardy-Weiberg;  $p$  = probabilidade.

Para o loco *MTHFR* 1298, também não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre casos e controles quando calculados os *odds-ratio*, considerando cada alelo e cada genótipo como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (tabela 6). Observa-se que o genótipo AC apresenta uma diferença no sentido de aumentar o risco de susceptibilidade ao câncer, tendo valor de *odds ratio* igual a 1,682, embora não seja estatisticamente significativo.

Tabela 6: *Odds ratio* de casos e controles para alelos e genótipos do loco *MTHFR* 1298.

	<i>OR</i>	IC 95%	<i>p</i>
<b>ALELOS</b>			
A	1,098	0,747 - 1,613	0,685
C	0,911	0,620 - 1,338	0,685
<b>GENÓTIPOS</b>			
AA vs. CC	1,085	0,458 – 2,572	0,998
AA vs. AC	0,621	0,298 – 1,292	0,228
AC vs. AA	1,609	0,774 – 3,354	0,228
AC vs. CC	1,746	0,879 – 3,478	0,119
CC vs. AA	0,922	0,389 – 2,185	0,998
CC vs. AC	0,573	0,288 – 1,138	0,119
AA vs. AC + CC	0,736	0,366 – 1,478	0,446
AC vs. AA + CC	1,682	0,960 – 2,952	0,070
CC vs. AA + AC	0,651	0,337 – 1,252	0,220
AA + CC vs. AC	0,594	0,339 – 1,042	0,070
AA + AC vs. CC	1,537	0,799 – 2,963	0,220
AC + CC vs. AA	1,359	0,677 – 2,733	0,446

*OR* = *Odds ratio*; IC = intervalo de confiança; *p* = probabilidade.

#### 5.4 Análise da combinação genotípica dos dois SNPs do gene *MTHFR*

Analisando as combinações genotípicas, o número amostral reduziu-se para 110 casos e 107 controles, uma vez que nem todos os indivíduos puderam ser genotipados para os dois locos.

Quando calculados os *odds ratio* das combinações genotípicas para analisar a associação dos genótipos ao câncer de mama, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 7.

Observando a tabela 8, pode-se notar que algumas combinações genotípicas tendem a aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer mamário (aquelas em que os *OR* são mais elevados). Das combinações que apresentaram maior risco isoladamente, foi feita a análise contra as combinações que não apresentaram risco (tabela 8). Quando comparados os indivíduos que apresentam o genótipo *MTHFR* 677CC ou CT e 1298AC, há um risco 2x aumentado de chance de que uma pessoa com esse genótipo venha a desenvolver câncer de mama, sendo o valor de *p* significativo, igual a 0,012. Isto quer dizer que o genótipo *MTHFR* 1298AC apresenta uma diferença no sentido de aumentar o risco de susceptibilidade ao cân-

cer, a não ser que ele esteja presente junto com o genótipo *MTHFR* 677TT, que tende a conferir proteção.

**Tabela 7: Odds ratio das combinações genotípicas dos locos *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C de casos e controles.**

GENÓTIPO DE RISCO vs. demais genótipos	CONTROLES n = 107 (%)	CASOS n = 110 (%)	OR	IC 95%	p
CC AA	08 (07,48)	05 (04,54)	0,589	0,161 – 2,074	0,533
CC AC	14 (13,08)	25 (22,73)	1,954	0,904 – 4,260	0,094
CC CC	18 (16,82)	13 (11,82)	0,663	0,287 – 1,521	0,390
CT AA	14 (13,08)	11 (10,00)	0,738	0,295 – 1,835	0,617
CT AC	27 (25,23)	37 (33,64)	1,502	0,800 – 2,824	0,227
CT CC	07 (06,54)	09 (08,18)	1,273	0,414 – 3,971	0,840
TT AA	03 (02,80)	05 (04,54)	1,651	0,333 – 8,975	0,748
TT AC	11 (10,28)	05 (04,54)	0,416	0,121 – 1,356	0,175
TT CC	05 (04,67)	00 (00,00)	0,000	0,493 – 1,109	0,065

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; p = probabilidade.

**Tabela 8: Odds ratio das combinações genotípicas de risco dos locos *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C de casos e controles.**

GENÓTIPO DE RISCO vs. demais genótipos	CONTROLES n = 107 (%)	CASOS n = 110 (%)	OR	IC 95%	p
CC AC + CT AC	41 (38,32)	62 (56,36)	2,079	1,167 – 3,712	0,012

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; p = probabilidade.

Seguindo o mesmo princípio da análise anterior, foi calculado o risco de desenvolver câncer de mama para aqueles genótipos que, separadamente, indicavam proteção (aqueles que na tabela 9 apresentam OR inferior a 1,0). Na tabela 9 pode-se ver a análise quando combinados os duplo homozigotos (CC AA, CC CC, TT CC e ainda esses homozigotos mais a combinação TT AC). Nessas duas análises, o OR indica proteção por ser menor que 1,0 e apresenta p significativo, sendo 0,039 na primeira e 0,006 na segunda.

**Tabela 9: Odds ratio das combinações genotípicas de proteção dos locos *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C de casos e controles**

GENÓTIPO DE PROTEÇÃO vs. demais genótipos	CONTROLES n = 107 (%)	CASOS n = 110 (%)	OR	IC 95%	p
CC AA + CC CC + TT CC	31 (28,97)	18 (16,36)	0,480	0,236 – 0,968	0,039
CC AA + CC CC + TT CC + TT AC	42 (39,25)	23 (20,91)	0,409	0,214 – 0,778	0,006

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; p = probabilidade.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Frequências genotípicas e alélicas

Como se observa nas tabelas 3 e 5, as duas populações (controles e casos) encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois locos analisados, com exceção da população de casos para o loco *MTHFR* 1298, que apresenta excesso de heterozigotos. Imagina-se que isso possa ser devido ou a um viés amostral, ou que esteja indicando associação à doença.

As tabelas 10 e 11 apresentam frequências genotípicas e alélicas dos dois SNPs do gene *MTHFR* encontradas em diversas populações, inclusive a população de Santa Catarina, representada pelos dados obtidos neste trabalho.

Quando comparadas às outras populações brasileiras, percebe-se que as frequências genotípicas e alélicas do SNP *MTHFR* C677T do estado de Santa Catarina assemelham-se às frequências das populações do Rio Grande do Sul e de São Paulo (tabela 10). Comparando essas populações às demais, vê-se que têm maior identidade com as populações européias, provavelmente devido à colonização desses estados, que ocorreu com prevalência de europeus (PIAZZA, 1982).

Outro dado interessante que pode ser observado na tabela 10 é a frequência do alelo *MTHFR* 677T nas populações da Bahia e de Pernambuco, a qual é menor que nas já mencionadas e se aproxima às frequências encontradas nas populações africanas e sul-ameríndias. Esse dado corrobora o fato de que a população da Bahia e de Pernambuco são formadas por grande percentual de afro-descendentes, devido às atividades escravistas desenvolvidas no período de colonização do Brasil e por ameríndios (RIBEIRO, 1997; MORTON *et al.*, 1966).

**Tabela 10: Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do SNP *MTHFR* C677T em diversas populações, incluindo a população do presente estudo.**

<b>População</b>	<b>n</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>Publicação</b>
<i>Asiáticas</i>							
Taiwan	530	0,506	0,417	0,077	0,71	0,29	CHENG <i>et al.</i> , 2008
Coréia do Sul	198	0,369	0,505	0,126	0,62	0,38	CHOI <i>et al.</i> , 2003
<i>Européia</i>							
França	133	0,376	0,526	0,098	0,64	0,36	MORNET <i>et al.</i> , 1997
Alemanha	153	0,490	0,400	0,110	0,69	0,31	KOCH <i>et al.</i> , 1998
Irlanda	1309	0,458	0,434	0,108	0,68	0,32	BOTTO & YANG, 2000
Itália	2053	0,305	0,515	0,180	0,56	0,44	BOTTO & YANG, 2000
Polônia	211	0,560	0,350	0,090	0,74	0,26	SZCZEKLIK <i>et al.</i> , 2001
<i>Eurasiática</i>							
Turquia	226	0,469	0,456	0,075	0,70	0,30	SAZCI <i>et al.</i> , 2003
<i>Africanas</i>							
República Central Africana	52	0,818	0,182	0,000	0,91	0,09	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1998
Gâmbia	24	0,875	0,125	0,000	0,94	0,06	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1998
Quênia	61	0,902	0,098	0,000	0,95	0,05	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1998
Madagascar	97	0,866	0,134	0,000	0,93	0,07	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1998
<i>Ameríndias</i>							
Quechua (Peru)	72	0,950	0,050	0,000	0,98	0,02	MONSALVE <i>et al.</i> , 2003
Aché (Paraguai)	30	0,800	0,200	0,000	0,90	0,10	MONSALVE <i>et al.</i> , 2003

Continua

Continuação

**Tabela 110: Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do SNP *MTHFR* C677T em diversas populações, incluindo a população do presente estudo.**

População	n	CC	CT	TT	C	T	Publicação
<i>Oceania</i>							
Austrália	225	0,391	0,502	0,107	0,64	0,36	WILCKEN, 1996
<i>Americanas</i>							
Colômbia	150	0,280	0,467	0,253	0,51	0,49	BOTTO & YANG, 2000
Canadá	414	0,416	0,442	0,142	0,64	0,36	BOTTO & YANG, 2000
Estados Unidos	3129	0,447	0,422	0,131	0,66	0,34	BOTTO & YANG, 2000
BR - Bahia	843	0,585	0,362	0,053	0,77	0,23	COUTO <i>et al.</i> , 2004
BR - Pernambuco	50	0,500	0,460	0,040	0,73	0,27	SILVA <i>et al.</i> , 2006
BR - São Paulo	75	0,400	0,470	0,130	0,63	0,37	CUNHA <i>et al.</i> , 2002
BR - Rio Grande do Sul	100	0,380	0,520	0,100	0,64	0,36	BRANDALIZE <i>et al.</i> , 2007
<b>BR - Santa Catarina (controles)</b>	<b>114</b>	<b>0,377</b>	<b>0,447</b>	<b>0,176</b>	<b>0,60</b>	<b>0,40</b>	

Tabela 11: Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do SNP *MTHFR* A1298C em diversas populações, incluindo a população do presente estudo.

População	n	AA	AC	CC	A	C	Publicação
<i>Asiática</i>							
Taiwan	534	0,580	0,388	0,032	0,77	0,23	CHENG <i>et al.</i> , 2008
<i>Européias</i>							
Turquia	226	0,504	0,412	0,084	0,71	0,29	SAZCI <i>et al.</i> , 2003
Alemanha	634	0,470	0,420	0,120	0,68	0,32	JUSTENHOVEN <i>et al.</i> , 2005
Áustria	389	0,473	0,432	0,095	0,69	0,31	FODINGER <i>et al.</i> , 2001
Reino Unido	754	0,518	0,404	0,078	0,72	0,28	DEKOU <i>et al.</i> , 2001
Polônia	211	0,640	0,320	0,040	0,80	0,20	SZCZEKLIK <i>et al.</i> , 2001
<i>Eurasiática</i>							
Arábia Saudita	511	0,468	0,431	0,102	0,85	0,15	SIRAJ <i>et al.</i> , 2007.
<i>Africana</i>							
África do Sul	114	0,614	0,342	0,044	0,79	0,21	GEBHARDT <i>et al.</i> , 2001
<i>Ameríndias</i>							
Quechua (Peru)	72	0,970	0,030	0,000	0,99	0,01	MONSALVE <i>et al.</i> , 2003
Aché (Paraguai)	25	1,000	0,000	0,000	1,00	0,00	MONSALVE <i>et al.</i> , 2003
<i>Americanas</i>							
Canadá	780	0,510	0,396	0,094	0,71	0,29	KOTSOPOULOS <i>et al.</i> , 2008
Estados Unidos	2101	0,505	0,419	0,076	0,71	0,29	ROBIEN & ULRICH, 2003
BR - São Paulo	75	0,560	0,370	0,070	0,75	0,25	CUNHA <i>et al.</i> , 2002
BR - Pernambuco	50	0,540	0,440	0,020	0,76	0,24	SILVA <i>et al.</i> , 2006
<b>BR - Santa Catarina (controles)</b>	<b>111</b>	<b>0,227</b>	<b>0,491</b>	<b>0,282</b>	<b>0,47</b>	<b>0,53</b>	

Considerando o SNP *MTHFR* A1298C (tabela 11), pode-se observar que na população de Santa Catarina as frequências são bastante peculiares, não sendo similares às frequências de nenhuma outra população pesquisada, sendo a frequência do alelo mutante a mais alta dentre as encontradas na literatura e acima daquela do alelo selvagem. Em populações ameríndias o alelo mutante ou está ausente ou em baixíssima frequência. Em populações de origem alemã foi verificada a mais alta frequência já encontrada até então, 0,32, 65% menor da encontrada no presente estudo, 0,53.

Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar a frequência aumentada do alelo mutante na população de SC. A primeira é deriva genética. Em algum momento ocorreu um evento ao acaso que fez com que a frequência do alelo C aumentasse. A segunda hipótese é a seleção desse alelo, direta ou indiretamente, se ele estiver em desequilíbrio de ligação com outro gene que esteja de fato sendo selecionado nessa população. Pode-se excluir a hipótese de fluxo gênico, uma vez que nenhuma outra população estudada até o momento apresenta frequência do alelo mutante tão alta como a verificada neste trabalho.

## 6.2 Análise de associação

Como se pode observar nas tabelas 4, 6 e 8, não foi encontrada nenhuma associação entre os genótipos dos SNPs do gene *MTHFR* isoladamente e o câncer de mama, assim como o resultado dos trabalhos de KOTSOPOULOS *et al.* (2008) na população canadense, JUSTENHOVEN *et al.* (2005) na alemã, KALEMI *et al.* (2005) na grega e LANGSENLEHNER *et al.* (2003) na austríaca.

Um estudo feito em Taiwan por CHOU *et al.* (2006) mostra que os alelos *MTHFR* 677T e 1298C diminuem o risco do seu portador desenvolver câncer de mama ( $OR = 0,81$  e  $0,57$  para *MTHFR* 677CT + TT e *MTHFR* 1298AC + CC, respectivamente). SHARP *et al.* (2002) encontraram na população escocesa relação de proteção do genótipo *MTHFR* 1298CC ( $OR = 0,24$ ) e da composição genotípica *MTHFR* 677TT e 1298CC ( $OR = 0,26$ ) contra a doença.

Ao contrário do observado na população de Santa Catarina, ERGUL *et al.* (2003) acharam na população da Turquia associação entre o alelo *MTHFR* 677T ( $\chi^2$

= 7,234,  $p = 0,027$ ) e o genótipo *MTHFR* 677TT ( $OR = 2,5$ ) e o câncer de mama, enquanto no presente trabalho o alelo T parece ser um fator de proteção à doença, ainda que não tenha alcançado valor de  $p$  significativo (tabela 4). Os mesmos autores afirmam que o genótipo *MTHFR* 1298CC é fator de risco para o desenvolvimento de tumor mamário ( $OR = 1,9$ ), indo de encontro aos nossos resultados, onde vemos (tabela 6) que o alelo *MTHFR* 1298C tenderia à proteção e não ao aumento do risco de desenvolver a doença.

Na população da Itália, MACIS *et al.* (2007) também associaram o genótipo *MTHFR* 677TT à maior susceptibilidade de desenvolvimento da doença ( $OR = 2,51$ ), assim como SEMENZA *et al.* (2003) na população branca não-hispânica dos Estados Unidos ( $OR = 2,8$ ) e CAMPBELL *et al.* (2002) na população da Inglaterra ( $OR = 1,43$ ).

## 7. CONCLUSÃO

O número de amostras dos bancos de dados e de DNA de casos e controles do LAPOGE foi aumentado durante o período de realização deste trabalho, e outros trabalhos continuam fazendo esse esforço para que cada vez mais tenhamos um número amostral mais significativo e com maior poder estatístico.

As técnicas de PCR, digestão e eletroforese específicas para a genotipagem dos locos *MTHFR* 677 e 1298 foram otimizadas, e além de gerar este trabalho, poderão facilitar trabalhos futuros do nosso grupo de pesquisa.

Aqui foi descrito, pela primeira vez, um estudo de associação caso-controle para o gene *MTHFR* e o câncer de mama na população de Santa Catarina, assim como foi o primeiro estudo a identificar freqüências alélicas e genotípicas deste gene nesta população.

As amostras de controles e casos não diferem estatisticamente em relação aos seguintes hábitos: fumo, utilização de anticoncepcionais orais e terapia de reposição hormonal.

As freqüências genotípicas estão homoganeamente distribuídas entre controles e casos para o loco *MTHFR* 677, e entre os controles para o loco *MTHFR* 1298, mas os casos encontram-se fora do EHW para este loco.

As freqüências alélicas do SNP *MTHFR* 677 identificadas na população de Santa Catarina assemelham-se às da população européia e diferem das africanas e ameríndias, corroborando dados históricos.

As freqüências alélicas do SNP *MTHFR* 1298 identificadas na população de Santa Catarina diferem das de outras populações encontradas na literatura, sendo a freqüência do alelo mutante a mais alta já estimada.

Não foi encontrada associação entre os alelos dos SNPs *MTHFR* C677T e A1298C e o câncer de mama nesta população.

Isoladamente, os genótipos encontrados não apresentam associação com o CAMA, mas quando agrupadas as combinações genotípicas CC AC + CT AC, encontra-se associação significativa de predisposição ao CAMA.

Também agrupando classes genotípicas, quando analisado o grupo CC AA + CC CC + TT CC, encontra-se associação significativa de proteção contra o CAMA.

Este estudo, embora singular, vem acrescentar dados ao conhecimento científico, dando suporte para a constante busca de ferramentas que auxiliem no diagnóstico e prognóstico do câncer de mama.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2004.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS): [www.cancer.org](http://www.cancer.org). Acesso em outubro de 2008.

AMORIM, L.M.F.; ROSSINI, A.; MENDONÇA, G.; LOTSCH, P.; ALMEIDA-SIMÃO, T.; GALLO, C.V.M.; PINTO, L. CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Letters*, v. 181, n. 2, p. 179 – 186, 2002.

ANDERSON, B.O.; SHYYAN, R.; ENIU, A.; SMITH, R.A.; YIP, C.H.; BESE, N.S.; CHOW, L.W.C.; MASOOD, S.; RAMSEY, S.D.; CARLSON, R.W. Breast cancer in limited-resource countries: an overview of the breast health global initiative 2005 guidelines. *The Breast Journal*, v. 12 Suppl. 1, p.3-15, 2006.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics*, v. 33, p. 238 – 247, 2003.

BEAUSEJOUR, C.M.; CAMPISI, J. Balancing regeneration and cancer. *Nature*, v. 443, n. 28, p. 404-405, 2006.

BISELLI, J.M.; GOLONI-BERTOLLO, E.M.; ZAMPIERI, B.L.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; PAVARINO-BERTELLI, E.C. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2008.

BLOUNT, B.C.; MACK, M.M.; WEHR, C.M.; MACGREGOR, J.T.; HIATT, R.A.; WANG, G.; WICKRAMASINGUE, S.N.; EVERSON, R.B.; AMES, B.N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 3290-3295, 1997.

BOCCIA, S.; HUNG, R.; RICCIARDI, G.; GIANFAGNA, F.; EBERT, M.P.A.; FANG, J.-Y.; GAO, C.-M.; GOTZE, T.; GRAZIANO, F.; LACASANA-NAVARRO, M.; LIN, D.; LOPEZ-CARRILLO, L.; QIAO, Y.-L.; SHEN, H.; STOLZENBERG-SOLOMON, R.; TAKEZAKI, T.; WENG, Y.-R.; ZHANG, F.F.; DUIJN, C.M.; BOFFETTA, P.; TAIOLI, E. Meta- and Pooled Analyses of the Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: A Huge-GSEC Review. *American Journal of Epidemiology*, v. 167, n. 5, p. 505-516, 2007.

BOTTIGLIERI, T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 29, p. 1103–1112, 2005.

BOTTO, L.D.; YANG, Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, n. 9, 2000.

BRANDALIZE, A.P.C.; BANDINELLI, E.; BORBA, J.B.; FÉLIX, T.M.; ROISENBERG, I.; SCHÜLER-FACCINI, L. Polymorphisms in genes *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 787-791, 2007.

BREASTCANCER.ORG: <http://www.breastcancer.org>. Acesso em outubro de 2008.

BREAST HEALTH GLOBAL INITIATIVE (BHGI): <http://www.fhcr.org/science/phs/bhgi>. Acesso em outubro de 2008.

CAMPBELL, I.G.; BAXTER, S.W.; ECCLES, D.M.; CHOONG, D.Y.H. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 6, 2002.

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica: volume 2, Biologia molecular**. 2ª ed., São Paulo, Thomsom Learning, 2007.

CEBRIAN, A.; PHAROAH, P.D.; AHMED, S.; ROPERO, S.; FRAGA, M.F.; SMITH, P.L.; CONROY, D.; LUBEN, R.; PERKINS, B.; EASTON, D.F.; DUNNING, A.M.; ESTELLER, M.; PONDER, B.A.J. Genetic variants in epigenetic genes and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 27 n. 8 p.1661-1669, 2006.

CHENG, C-W.; YU, J-C.; HUANG, C-S.; SHIEH, J-C.; FU, Y-P.; WANG, H-W.; WU, P-E.; SHEN, C-Y. Polymorphism of cytosolic serine hydroxymethyltransferase, estrogen and breast cancer risk among Chinese women in Taiwan. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, p. 145 – 155, 2008.

CHOI, B.O.; KIM, N.K.; KIM, S.H.; KANG, M.S.; LEE, S.; AHN, J.Y.; KIM, O.J.; KIM, S.; OH, D. Homozygous C677T mutation in the *MTHFR* gene as an independent risk factor for multiple small-artery occlusions. **Thrombosis Research**, v. 111, p. 39 – 44, 2003.

CHOU, Y.C.; WU, M.H.; YU, J.C.; LEE, M.S.; YANG, T.; SHIH, H.L.; WU, T.Y.; SUN, C.A. Genetic polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma folate levels, and breast cancer susceptibility: A case-control study in Taiwan. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 11, p. 2295-2300, 2006.

COUTO, F.D.; ADORNO, E.V.; MENEZES, J.F.; NETO, J.P.M.; RÊGO, M.A.V.; REIS, M.G.; GONÇALVES, M.S. C677T polymorphism of the *MTHFR* gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 20, n. 2, p. 529 - 533, 2004.

CRESPI, B.; SUMMERS, K. Evolutionary biology of cancer. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 10, p. 545-552, 2005.

CUNHA, A.L.A.; HIRATA, M.H.; KIM, C.A.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; NON-OYAMA, K.; HIRATA, R.D.C. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the *MTHFR* gene in Brazilian children with neural tube defects. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 139 – 143, 2002.

DEKOU, V.; WHINCUP, P.; PAPACOSTA, O.; EBRAHIM, S.; LENNON, L.; UELAND, P.M.; REFSUM, H.; HUMPHRIES, S.E.; GUDNASON, V. The effect of the C677T and A1298C polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British regional heart study. **Atherosclerosis**, v. 154, p. 659 – 666.

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, p. 192-197, 2005.

DUNNING, A.M.; HEALEY, C.S.; PHAROAH, P.D.; TEARE, M.D.; PONDER, B.A.; EASTON, D.F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 8, p. 843-854, 1999.

DURGA, J.; BOXTEL, M.P.J.; SCHOUTEN E.G.; BOTS, M.L.; KOK, F.J.; VERHOEF, P. Folate and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation correlate with cognitive performance. **Neurobiology of Aging**, v. 273, p. 334–343, 2006.

ERGUL, E.; SAZCI, A.; UTKAN, Z.; CANTURK, N.Z. Polymorphisms in the *MTHFR* gene are associated with breast cancer. **Tumor Biology**, v. 24, p. 286–290, 2003.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, p. 89-92, 1983.

FODINGER, M.; BUCHMAYER, H.; HEINZ, G.; PAPAGIANNPOULOS, M.; KLETZMAYR, J.; PERSCHL, A.; VYCHYTIL, A.; HORL, W.H.; SUNDERPLASSMANN, G. Association of two *MTHFR* polymorphisms with total homocysteine plasma levels in dialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 1, p. 77 – 84, 2001.

FRISO, S.; CHOI, S.W.; GIRELLI, D.; MASON, B.; DOLNIKOWSKI, G.G.; BAGLEY, P.J.; OLIVIERI, O.; JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; CORROCHER, R.; SELHUB, J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99 n. 8, p 5606-5611, 2002.

GEBHARDT, G.S.; SCHOLTZ, C.L.; HILLERMANN, R.; ODENDAAL, H.J. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 97, n. 2, p. 174 – 177, 2001.

GENETICS HOME REFERENCE: <http://ghr.nlm.nih.gov/>. Acesso em outubro de 2008.

GERGER, A.; LANGSENLEHNER, U.; RENNER, W.; WEITZER, W.; EDER, T.; YAZDANI-BIUKI, B.; HOFMANN, G.; SAMONIGG, H.; KRIPPL, P. A multigenic approach to predict breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 104, p. 159–164, 2007.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 8ª edição, 2006.

HDS (Health Decision Strategies) EpiMax Calculator. Disponível em <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>. Acesso em novembro de 2008.

HUANG, Y.; HAN, S.; LI, Y.; MAO, Y.; XIE, Y. Different roles of *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. **Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 73–85, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA): <http://www.inca.org.br>. Acesso em outubro de 2008.

JONES, P.A.; LAIRD, P.W. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genetics**, v. 21, p. 163-167, 1999.

JUSTENHOVEN, C.; HAMANN, U.; PIERL, C.B.; RABSTEIN, S.; PESCH, B.; HARTH, V.; BAISCH, C.; VOLLMERT, C.; ILLIG, T.; BRÜNING, T.; KO, Y.; BRAUCH, H. One-Carbon Metabolism and Breast Cancer Risk: No Association of *MTHFR*, *MTR*, and *TYMS* Polymorphisms in the GENICA Study from Germany. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 14, n. 12, 2005.

KALEMI, T.G.; LAMBROPOULOS, A.F.; GUEORGUIEV, M.; CHRISAFI, S.; PAPANZIS, K.T.; KOTSIS, A. The association of *p53* mutations and *p53* codon 72, *Her 2* codon 655 and *MTHFR* C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. **Cancer Letters**, v. 222, p. 57 – 65, 2005.

KARA, I.; SAZCI, A.; ERGUL, E.; KAYA, G.; KILIC, G. Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk. **Molecular Brain Research**, v. 111, p. 84-90, 2003.

KOCH, M.C.; STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; SCHRÖTER, B.; ERMERT, A. Evaluation of the *MTHFR* C677T allele and the *MTHFR* gene locus in a German spina bifida population. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, p. 487 – 492, 1998.

KOTSOPOULOS, J.; ZHANG, W.W.; ZHANG, S.; MCCREADY, D.; TRUDEAU, M.; ZHANG, P.; SUN, P.; NAROD, S.A. Polymorphisms in folate metabolizing enzymes and transport proteins and the risk of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, disponível em <http://www.springerlink.com.w20049.dotlib.com.br/content/801m7j3216137p85/fulltext.pdf>. Acesso em outubro de 2008.

KUSCHEL, B.; AURANEN, A.; MCBRIDE, S.; NOVIK, K.L.; ANTONIOU, A.; LIPSCOMBE, J.M.; DAY, N.E.; EASTON, D.F.; PONDER, B.A.; PHAROAH, P.D.; DUN-

NING, A. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. **Human Molecular Genetics**, v. 11, p. 1399-407, 2002.

LAIRD, P.W.; JAENISCH, R. DNA methylation and cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 3, p. 1487-1495, 1994.

LANGSENLEHNER, U.; KRIPPL, P.; RENNER, W.; YAZDANI-BIUKI, B.; WOLF, G.; WASCHER, T.C.; PAULWEBER, B.; WEITZER, W.; SAMONIGG, H. The common 677C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 81, p. 169–172, 2003.

MACIEL, M.E. **Genes do biometabolismo: aspectos populacionais em euro-descendentes e afro-descendentes do sul do Brasil**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em Genética, 2007.

MACIS, D.; MAISONNEUVE, P.; JOHANSSON, H.; BONANNI, B.; BOTTERI, E.; IODICE, S.; SANTILLO, B.; PENCO, S.; GUCCIARDO, G.; D'AIUTO, G.; TURCO, M.R.; AMADORI, M.; COSTA, A.; DECENSI, A. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and breast cancer risk: a nested-case-control study and a pooled meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 106, p. 263–271, 2007.

MAO, R.; FAN, Y.; JIN, Y.; BAI, J.; FU, S. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and lung cancer: a meta-analysis. **Journal of Human Genetics**, v. 53, p. 340–348, 2008.

MARCHAND, L.; DONLON, T.; HANKIN, J.H.; KOLONEL, L.N.; WILKENS, L.R.; SEIFRIED, A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). **Cancer Causes and Control**, v. 13, p. 239–248, 2002.

MENKO, F.H.; LIGTENBERG, M.J.; BROUWER, T.; HAHN, D.E.; AUSEMS, M.G. DNA-based diagnosis of hereditary tumour predisposition. **Ned Tijdschr Geneesk**, v. 151, n. 5, p. 295-8, 2007.

MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P.A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L.M.; DING, W.; BELL, R.; ROSENTHAL, J.; HUSSEY, C.; TRAN, T.; MCCLURE, M.; FRYE, C.; HATTIER, T.; PHELPS, R.; HAUGEN-STRANO, A.; KATCHER, A.; YAKUMO, K.; GHOLAMI, Z.; NASS, S.J.; HERMAN, J.G.; GABRIELSON, E. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increase with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 60, p. 4346-4348, 2000.

MONSALVE, M.V.; SALZANO, F.M.; RUPERT, J.L.; HUTZ, M.H.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; HOCHACHKA, P.W.; DEVINE, D.V. Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) Allele Frequencies in Amerindians. **Annals of Human Genetics**, v. 67, p. 367 – 371, 2003.

MORNET, E.; MULLER, F.; LENVOISÉ-FURET, A.; DELEZOIDE, A.; COL, J.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J. Screening of the C677T mutation on the methylenetetra-

hydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. **Human Genetics**, v. 100, p. 512 – 514, 1997.

MORTON, N.E.; KRIEGER, H.; MI, M.P. Natural selection on polymorphisms in Northeastern Brazil. **American Journal of Human Genetics**, v. 18, p. 153 – 171, 1966.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em outubro de 2008.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York, Columbia University Press, 1987.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS): <http://www.who.org>. Acesso em outubro de 2008.

PASTERNAK, J.J. **Uma Introdução à Genética Molecular Humana: Mecanismos das Doenças Hereditárias**, 2<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.

PHAROAH, P.D.P.; TYRER, J.; DUNNING, A.M.; EASTON, D.F.; PONDER, B.A.J. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. **Public Library of Science Genetics**, v. 3, n. 3, p. 401-406, 2007.

PIAZZA, W.F. **A colonização de Santa Catarina**. Porto Alegre: BRDE, 1982.

QUINLIVAN, E.P.; DAVIS, R.S.; SHELNUTT, K.P.; HENDERSON, G.N.; GHANDOUR, H.; SHANE, B.; SELHUB, J.; BAILEY, L.B.; STACPOOLE, P.W.; GREGORY, J.F.; Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C→T Polymorphism and Folate Status Affect One-Carbon Incorporation into Human DNA Deoxynucleosides. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 389-396, 2005.

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil**, 2<sup>a</sup> edição. São Paulo: Schwarcz, 1997.

ROBIEN, K.; ULRICH, C.M. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A HuGE Minireview. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n. 7, 571 – 582, 2003.

ROHAN, T.E.; JAIN, M.G.; HOWE, G.R.; MILLER, A.B. Dietary Folate Consumption and Breast Cancer Risk. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 92, n. 3, p. 266-269, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SANTOS, K.; LEMOS-MARINI, S.H.V.; BAPTISTA, M.T.M.; BONADIA, L.C.; JUNIOR W.P.; BERTUZZO, C.S. Frequency of 677C T and 1298A C polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene in Turner syndrome individuals. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 41-44, 2006.

SAZCI, A.; ERGUL, E.; GUZELHAN, Y.; KAYA, G.; KARA, I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with schizophrenia. **Molecular Brain Research**, v. 117, p. 104 – 107, 2003.

SAZCI, A.; ERGUL, E.; KUCUKALI, I.; KARA, I.; KAYA, G. Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene with schizophrenia: Association is significant in men but not in women. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, p. 1113–1123, 2005.

SAZCI, A.; ERGUL, E.; TUNCER, N.; AKPINAR, G.; KARA, I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of *MTHFR* polymorphisms C677T and A1298C. **Brain Research Bulletin**, v. 71, p. 45–50, 2006.

SCHNEIDER, J.A.; REES, D.C.; LIU, Y.; CLEGG, J.B. Worldwide Distribution of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 1258 – 1260, 1998.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, v. 19, p.217–46, 1999.

SELZER, R.R.; ROSENBLATT, D.S.; LAXOVA, R.; HOGAN, K.N. Adverse effect of nitrous oxide in a child with 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **English Journal of Medicine**, v. 349, p. 45-50, 2003.

SEMENZA, J.C.; DELFINO, R.J.; ZIOGAS, A.; ANTON-CULVER, H. Breast cancer risk and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 77, p. 217–223, 2003.

SHARP, L.; LITTLE, J.; BROCKTON, N.T.; COTTON, S.C.; MASSON, L.F.; HAITES, N.E.; CASSIDY, J. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene, intakes of folate and related B vitamins and colorectal cancer: a case-control study in a population with relatively low folate intake. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 379-389, 2008.

SHARP, L.; LITTLE, J.; SCHOFIELD, A.C.; PAVLIDOU, E.; COTTON, S.C.; MIEDZYBRODZKA, Z.; BAIRD, J.O.C.; HAITES, N.E.; HEYS, S.D.; GRUBB, D.A. Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). **Cancer Letters**, v. 181, p. 65–71, 2002.

SHRUBSOLE, M.J.; GAO, Y.T.; CAI, Q.; SHU, X.O.; DAI, Q.; HÉBERT, J.R.; JIN, F.; ZHENG, W. *MTHFR* Polymorphisms, Dietary Folate Intake, and Breast Cancer Risk: Results from the Shanghai Breast Cancer Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, vol. 13, p. 190–196, 2004.

SHRUBSOLE, M.J.; JIN, F.; DAI, Q.; SHU, X.O.; POTTER, J.D.; HEBERT, J.R.; GAO, Y.T.; ZHENG, W. Dietary folate intake and breast cancer risk. **Cancer Research**, v. 61, p. 7136-7141, 2001.

SILVA, V.C.; RAMOS, F.J.C.; FREITAS, E.M.; BRITO-MARQUES, P.R.; D'ALMEIDA, V.; CAVALCANTI, M.N.H.; CABRAL-FILHO, J.E.; MUNIZ, M.T.C. Alzheimer's disease in Brazilian elderly has a relation with homocysteine but not with *MTHFR* polymorphisms. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 4, p. 941 – 945, 2006.

SIRAJ, A.K.; IBRAHIM, M.; AL-RASHEED, M.; BU, R.; BAVI, O.; JEHAN, Z.; AB-UBAKER, J.; MURAD, W.; AL-DAYEL, F.; EZZAT, A.; EL-SOLH, H.; UDDIN, S.; AL-KURAYA, K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and promoter methylation of *MGMT* and *FHIT* genes in diffuse large B cell lymphoma risk in Middle East. **Annals of Hematology**, v. 86, p. 887–895, 2007.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T.; KANE, E.; ROMAN, E.; ROLLINSON, S.; CARTWRIGHT, R.A.; MORGAN, G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96 n. 22, p. 12810-12815, 1999.

SMITH, T.R.; MILLER, M.S.; LOHMAN, K.K.; CASE, L.D.; HU, J.J. DNA damage and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v.24, p. 883-889, 2003.

STRACHAN T, READ AP. **Genética Molecular Humana**. 2ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2002.

SUZUKI, T.; MATSUO, K.; HIROSE, H.; HIRAKI, A.; KAWASE, T.; WATANABE, M.; YAMASHITA, T.; IWATA, H.; TAJIMA, K. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 29 n. 2 p. 356–362, 2008.

SZCZEKLIK, A.; SANAK, M.; JANKOWSKI, M.; DROPINSKI, J.; CZACHOR, R.; MUSIAL, J.; AXENTI, I.; TWARDOWSKA, M.; BRZOSTEK, T.; TENDERA, M. Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase; risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia. *American Journal of Medical Genetics*, v. 101, p. 36 – 39, 2001.

TORRESAN, C. **Estudo dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1A1* em cânceres mamários esporádicos**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em Genética, 2006.

UELAND M, HUSTAD S, SCHNEEDE J, REFSUM H, VOLLSET SE. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22 n. 4, p. 195-201, 2001.

VAN DER PUT, N.M.J.; GABREELS, F.; STEVENS, E.M.B.; SMEITINK, J.A.M.; TRIJBELS, F.J.M.; ESKES, T.K.A.B.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BLOM, H.J. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 1044-1051, 1998.

WEISBERG, I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN, B.; SIBANI, S.; ROZEN, R. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) Associated with Decreased Enzyme Activity. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 64, p. 169–172, 1998.

WILCKEN, D.E.L.; WANG, X.L.; SIM, A.S.; McCREDIE, R.M. Distribution in Healthy and Coronary Populations of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) C677T Mutation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 16, p. 878 – 882, 1996.

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

WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J.; COLLINS, N.; GREGORY, S.; GUMBS, C.; MICKLEM, G. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. **Nature**, v. 378, p. 789-792, 1995.

XU, X.; GAMMON, M.D.; ZHANG, H.; WETMUR, J.G.; RAO, M.; TEITELBAUM, S.L.; BRITTON, J.A.; NEUGUT, A.I.; SANTELLA, R.M.; CHEN, J. Polymorphisms of one-carbon-metabolizing genes and risk of breast cancer in a population-based study. **Carcinogenesis**, v. 28 n. 7 p. 1504–1509, 2007.

YI, P.; POGRIBNY, I.P.; JAMES, S.J. Multiplex PCR for simultaneous detection of 667 C → T and 1298 A → C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. **Cancer Letters**, v. 181, p. 209-213, 2002.

ZHENG, W.; DEITZ, A.C.; CAMPBELL, D.R.; WEN, W.Q.; CERHAN, J.R.; SEL-  
LERS, T.A.; FOLSOM, A.R.; HEIN, D.W. N-acetyltransferase genetic polymorphism, cigarette smoking, well-done meat intake, and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 8, p. 233-9, 1999.

ZINTZARAS, E. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta-analysis. **Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 943–953, 2007.

ZINTZARAS, E.; GIANNOULI, S.; RODOPOULOU, P.; VOULGARELIS, M. The role of *MTHFR* gene in multiple myeloma. **Journal of Human Genetics**, v. 53, n. 6, p. 499-507, 2008.

## ANEXO A – PARECER CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**PARECER Nº 027/2006**

**Registro CONEP: 13312** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**CAAE:** não informado **Processo nº 25000.138172/2006-80**  
**Projeto de Pesquisa:** *"Câncer de Mama: avaliação de parâmetros informativos e prognósticos na população do estado de Santa Catarina"*  
**Pesquisador Responsável:** Dr<sup>a</sup>. Iliada Rainha de Souza  
**Instituição:** Universidade Federal de Santa Catarina  
**Área Temática Especial:** Genética/Humana  
**Patrocinador:** Fundação de Ciência e Tecnologia – FUNCITEC

**Sumário Geral do Protocolo**

Este estudo tem como propósito estabelecer os fatores de risco relacionadas com o desenvolvimento da neoplasia mamária no Estado de Santa Catarina. O

material a ser estudado será obtido mediante coleta de sangue periférico de mulheres com câncer de mama, virgens de tratamento, através de punção venosa e de biópsias de tumores de mama obtidos através de procedimento cirúrgico.

Deverão participar aproximadamente 200 mulheres, entre portadoras de câncer de mama hereditário ou esporádico e grupo controle. Das mulheres com câncer de mama serão coletados 15 mL de sangue periférico, sendo 10 mL utilizados para a extração do DNA e 5 mL utilizados na cultura temporária de linfócitos, para estudo de aberrações cromossômicas. Serão também coletados fragmentos de tumores de mama das pacientes submetidas à cirurgia, sendo utilizados para a extração do DNA genômico, confirmação do diagnóstico e análises imuno-histoquímicas.

Além das análises epidemiológicas, análises moleculares e citogenéticas determinarão a relação dos polimorfismos estudados, em separado ou em conjuntamente, com os fatores de risco e o câncer de mama. Estes resultados terão

**Cont. Parecer 027/2007.**

arquivado por decurso de prazo. O projeto foi corrigido, apresentado novamente, e está classificado corretamente quanto à área temática - Genética Humana.

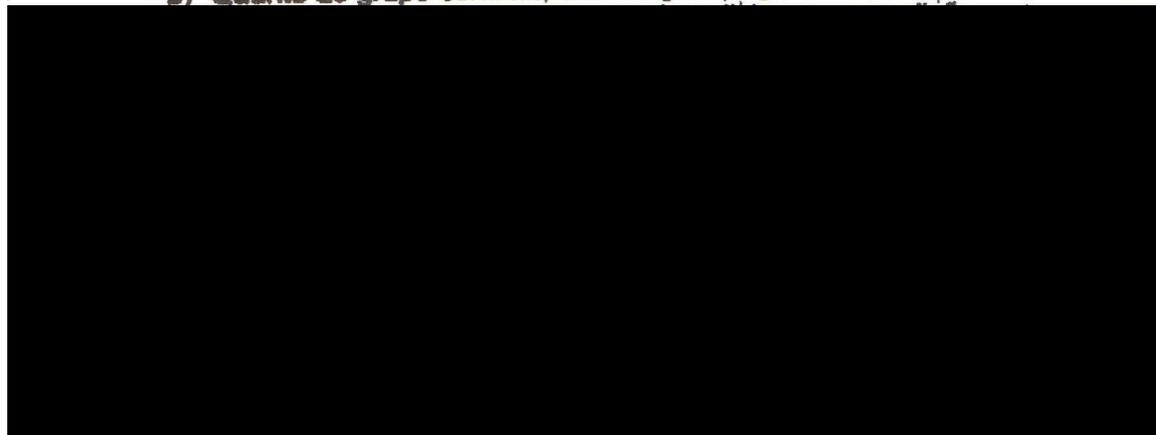
Segundo o protocolo, serão identificadas as portadoras de mutações no gene TP53 de câncer familiar, contudo no Termo de Consentimento Livre Esclarecido - TCLE não é oferecida a possibilidade de obtenção de resultados da pesquisa pelo sujeito de pesquisa.

Portanto, fez-se necessário o atendimento dos itens descritos abaixo:

1. Que seja incluída no TCLE a possibilidade de obtenção de resultados da pesquisa pelo participante.
2. Esclarecimento sobre o grupo controle do projeto.
  - a) O que será feito com os eventuais resultados positivos para mutação neste gen em mulheres do grupo controle que não tenham desenvolvido câncer de mama.
  - b) Se o sujeito de pesquisa for enquadrado nesse caso (resultado positivo para o gen mutante), será encaminhado para serviço especializado.

**Análise das respostas da pesquisadora às pendências identificadas pela CONEP:**

- a) A pesquisadora apresentou nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido possibilitando os resultados da pesquisa ao participante, se for do interesse deste e encaminhamento ao aconselhamento genético quando for o caso.
- b) Quanto ao grupo controle, a avaliação do gene TP53 não será realizada



- nestes indivíduos. A metodologia já explicita essa condição.
- b) O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição.

## ANEXO B - QUESTIONÁRIO

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

### QUESTIONÁRIO

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_      **Entrevistador:** \_\_\_\_\_  
**Coleta:** ( ) sangue    ( ) tumor      **Médico responsável:** \_\_\_\_\_

---

#### Dados Pessoais:

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_  
Profissão: \_\_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_  
Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M    ( ) F      Tipo de san-  
gue: \_\_\_\_\_  
Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_  
Naturalidade: \_\_\_\_\_ Descendência: \_\_\_\_\_  
Etnia: ( ) Euro-descendente    ( ) Afro-descendente  
      ( ) Indígena-descendente    ( ) Asiático-descendente

---

#### Dados dos Pais:

Nome do pai: \_\_\_\_\_  
Naturalidade: \_\_\_\_\_ Descendência: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
Nome da mãe: \_\_\_\_\_  
Naturalidade: \_\_\_\_\_ Descendência: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Possui Irmãos: ( ) Sim    ( ) Não      Quantos: \_\_\_\_\_

---

#### Hábitos:

Come FRUTAS regularmente? ( ) Sim    ( ) Não  
Tipo: \_\_\_\_\_  
Frequência: \_\_\_\_\_ Que tipo nunca come? \_\_\_\_\_  
Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? ( ) Sim    ( ) Não  
Tipo: \_\_\_\_\_  
Frequência: \_\_\_\_\_ Que tipo nunca come? \_\_\_\_\_  
Come CARNE regularmente? ( ) Sim    ( ) Não  
Tipo: \_\_\_\_\_  
Frequência: \_\_\_\_\_ Que tipo nunca come? \_\_\_\_\_  
Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? ( ) Sim    ( ) Não  
Frequência: ( ) Todos os dias    ( ) Fim de semana      ( ) Esporadicamente  
Quantidade: \_\_\_\_\_  
Que tipo de bebida alcoólica ingere mais freqüentemente?  
( ) Cerveja    ( ) Vinho    ( ) Cachaça    ( ) Outro \_\_\_\_\_  
Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?  
( ) Cerveja    ( ) Vinho    ( ) Cachaça    ( ) Outro \_\_\_\_\_  
Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? ( ) Sim    ( ) Não  
Tipo: \_\_\_\_\_  
Frequência: \_\_\_\_\_

FUMA? ( ) Sim ( ) Não FUMOU? ( ) Sim ( ) Não  
 Tipo: ( ) Cigarro ( ) Charuto ( ) Cachimbo ( ) Outro \_\_\_\_\_  
 Quantidade e Frequência: \_\_\_\_\_  
 Tempo que fuma ou fumou: \_\_\_\_\_  
 Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_

---

### Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_ MENOPAUSA: ( ) Sim ( ) Não Idade: \_\_\_\_\_  
 PARIDADE: ( ) nulípara \_\_\_\_\_ Idade da 1ª Gestação \_\_\_\_\_  
 Amamentou: ( ) Sim ( ) Não Tempo total: \_\_\_\_\_ Abortos: ( ) P \_\_\_\_\_ ( ) E \_\_\_\_\_  
 Trat. Hormonal: ( ) AC Tempo total: \_\_\_\_\_ ( ) Outros Tempo total: \_\_\_\_\_

---

### Histórico Médico

Casos de CÂNCER na família? ( ) Sim ( ) Não  
 Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Tipo de Câncer: \_\_\_\_\_  
 Casos de TUMOR BENIGNO? ( ) Sim ( ) Não  
 Local: \_\_\_\_\_  
 Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Tem ou teve alguma outra doença grave? \_\_\_\_\_

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? ( ) Sim ( ) Não  
 Tipo: \_\_\_\_\_ Tempo que utilizou: \_\_\_\_\_

Histórico do CAMA:

---



---



---



---

Observações:

---



---



---

## ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

### 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 isto pedimos sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados ao reparo de DNA) e o aparecimento desta doença. 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**, não influenciando 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, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. 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. Maria Cecília Menks Ribeiro.

#### **Procedimentos:**

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc.

Também precisaremos de um pedacinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e de tirar um pouco de sangue numa 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 mantidos 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, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecida sobre a pesquisa “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_