



Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Polimorfismos do gene *CYP19*:
associação com cancro da mama e com concentrações séricas de
hormonas sexuais em mulheres pós-menopáusicas**

Rita Mafalda Rocha Sousa do Carmo Fernando

2010

Dissertação destinada a provas de habilitação ao grau de Mestre em Ginecologia Oncológica, pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, realizada sob orientação científica do Professor Doutor Carlos Freire de Oliveira e da Professora Doutora Henriqueta Silva.

Ao meu marido, Pedro Alexandre
e aos meus filhos, Maria Mafalda e João David

Agradecimentos

Desejo manifestar o meu reconhecimento a todos os que contribuíram directa ou indirectamente para a realização deste trabalho:

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Freire de Oliveira, Professor Catedrático de Ginecologia, Director do Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), pelo estímulo à investigação científica que desde sempre me soube inculcar.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Henriqueta Silva, do serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), pela amizade e pelo apoio científico e humano, crucial em todas as fases da realização deste trabalho.

À Dra. Fátima Leitão, responsável pelo laboratório de Hormonologia e Monitorização de Fármacos dos HUC e aos seus colaboradores, pela realização do estudo hormonal.

Ao Dr. Luís Mesquita e a todos os elementos do serviço de Genética Médica da FMUC, pelo contributo dado na realização do estudo genético.

Às Dras. Fátima Peralta (MBB), Filomena Ramos (HIP) e Sofia Saleiro (HUC) pela colaboração no recrutamento da população incluída neste estudo.

Ao Professor Doutor Vítor Rodrigues e à minha irmã, Salomé Sousa, pelo apoio dado na análise estatística.

Ao Dr. Daniel Pereira da Silva, Director do Serviço de Ginecologia do Instituto Português de Oncologia (IPO) de Coimbra ao qual pertença, pelo incentivo na realização deste trabalho e pelo seu contributo inestimável na minha formação em cirurgia oncológica.

À minha família, em especial ao meu marido e aos meus filhos, sempre presentes e a quem privei da minha companhia e do meu apoio, enquanto realizava este trabalho.

A todos a minha gratidão.

Este trabalho foi financiado pelo CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia).

Índice

Resumo	8
Abstract	11
I. Introdução	13
1. Susceptibilidade genética para o cancro da mama	13
2. Marcadores genéticos: os polimorfismos	14
3. Estrogénios e cancro da mama	16
4. Outras hormonas sexuais endógenas e cancro da mama	17
5. Actividade da aromatase	18
6. Polimorfismos do gene <i>CYP 19</i>	20
II: Objectivos	24
III: Material e Métodos	25
1. População	25
2. Caracterização genotípica	26
2.1. Extracção do DNA	26
2.2. Quantificação do DNA	27
2.3. Estudo do Polimorfismo <i>CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T</i>	27
2.4. Estudo do Polimorfismo <i>CYP 19 G>A</i>	28
2.5. Estudo do Polimorfismo por repetição do tetranucleótido (<i>TTTA</i>) _n	29
3. Doseamentos hormonais	30
4. Análise estatística	31
IV. Resultados	32
1. Caracterização da população	32
2. Caracterização dos tumores	33
3. Comparação das frequências alélicas e genotípicas	34

4. Análise dos níveis séricos das hormonas sexuais	36
5. Associação entre genótipos e factores de prognóstico	39
5.1. Estádio da doença	39
5.2. Grau de diferenciação tumoral	41
5.3. Receptores hormonais a nível do tumor	42
5.4. Marcação tumoral de HER2	46
6. Estudo do desequilíbrio de ligação entre os diferentes polimorfismos	48
V. Discussão	50
VI. Conclusões e perspectivas futuras	57
VII. Bibliografia	59
VIII. Apêndice	64

Resumo

O cancro da mama está associado a exposição prolongada a hormonas sexuais, estando os seus níveis circulantes relacionados com o risco de cancro da mama em mulheres pós-menopáusicas. Após a menopausa, a principal fonte de estrogénios é o tecido adiposo, através da conversão local dos androgénios em estrogénios. A enzima aromatase, pertencente ao citocromo P450, catalisa a conversão dos androgénios em estrogénios, sendo uma enzima chave na biossíntese dos estrogénios. É codificada pelo gene *CYP19*, localizado no braço longo do cromossoma 15 (15q21.1).

Vários estudos sugerem uma relação entre polimorfismos do gene *CYP19* e susceptibilidade para cancro da mama. Os resultados são, no entanto, discordantes entre os diferentes autores. Entre os polimorfismos estudados do gene *CYP19*, incluem-se o polimorfismo por repetição de tetranucleótido (*TTTA*)_n, no intrão 4, em que um número elevado de repetições foi associado a aumento do risco para cancro da mama; o polimorfismo do *CYP19* *C*¹⁵⁵⁸-*T*, no exão 10, na região 3' não traduzida (3'UTR) com a variante *TT* associada a um perfil hiper-estrogénico e risco aumentado de cancro da mama e o polimorfismo do *CYP19* *G*>*A*, exão 3, para o qual a variante *AA* foi igualmente associada a risco de cancro da mama e a um perfil hiper-estrogénico.

O principal objectivo deste estudo foi avaliar o efeito dos polimorfismos do gene *CYP19* na susceptibilidade e prognóstico do cancro da mama e correlacionar estes polimorfismos com os níveis séricos das hormonas sexuais, em mulheres pós-menopáusicas. Estudámos o polimorfismo por repetição de tetranucleótido (*TTTA*)_n, o polimorfismo do *CYP19* *C*¹⁵⁵⁸-*T* e o polimorfismo do *CYP19* *G*>*A* e determinámos os níveis séricos de estradiol, estrona, testosterona, androstenediona e *sex hormone binding globulin* (SHBG).

Estudaram-se 187 mulheres pós-menopáusicas com cancro da mama e um grupo controlo de 133 mulheres pós-menopáusicas sem patologia maligna. Foram avaliados os polimorfismos do gene *CYP19*: *CYP19* *C*¹⁵⁵⁸*T*, *CYP19* *G*>*A* e o STR (*TTTA*)_n, por técnicas de PCR em tempo real, RFLPs e análise de fragmentos por electroforese capilar, respectivamente. Os níveis séricos de estradiol, estrona, testosterona, androstenediona e SHBG foram determinados por *radioimmunoassay* (RIA).

Não se verificaram diferenças com significado estatístico para as frequências alélicas e genotípicas entre as duas populações para os polimorfismos *CYP19* *C*¹⁵⁵⁸*T* e *CYP19* *G*>*A*. No entanto, os genótipos *TT* (*CYP19* *C*¹⁵⁵⁸*T*) e *GG* (*CYP19* *G*>*A*) demonstraram maior tendência

para associação com cancro da mama, relativamente aos outros genótipos (OR=1,49, IC95%=0,93-2,39; p=0,09 e OR=1,68, IC95%=0,98-2,65; p=0,057, respectivamente). Quanto ao polimorfismo $(TTTA)_n$, o alelo $(TTTA)_{10}$ foi também mais frequente na população com cancro da mama (OR=2,33, IC95%=0,75-7,22; p=0,13) mas sem atingir significado estatístico. A análise dos genótipos com dois alelos com número de repetições ≥ 10 [$(TTTA)_{10/11}$; $(TTTA)_{11/11}$ e $(TTTA)_{11/12}$], revelou uma associação estatisticamente significativa com cancro da mama (OR=1,92, IC95%=1,01-3,59; p=0,04).

O estudo hormonal foi efectuado em 32 mulheres com cancro da mama e 98 mulheres do grupo de controlo. Os níveis séricos de estradiol foram significativamente mais elevados na população controlo (p=0,002), assim como os de testosterona (p=0,05) e os níveis médios de SHBG mais baixos (p=0,05). Na população com cancro da mama, os níveis séricos de estrona e androstenediona foram mais elevados, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa. A análise da variação dos níveis séricos hormonais com os diferentes genótipos dos polimorfismos estudados revelou um ligeiro aumento dos níveis de estradiol e estrona nas mulheres com cancro da mama associado aos genótipos *TT* do *CYP19C¹⁵⁵⁸T* e *GG* do *CYP19 G>A*, embora sem significado estatístico. No grupo controlo, o alelo $(TTTA)_{11}$ associou-se a níveis médios de estrona significativamente inferiores em relação aos outros alelos (p=0,04). Não se observaram outras variações com significado estatístico ou clinicamente relevantes.

Foi estudada a relação entre as características dos tumores e os diferentes polimorfismos. O genótipo *TT* do polimorfismo *CYP19 C¹⁵⁵⁸T* e o genótipo *GG* do polimorfismo *CYP19 G>A* mostraram tendência para uma associação a tumores em estádios mais avançados (III e IV). Por outro lado, o genótipo *CC* e o genótipo *AA* associaram-se a tumores com grau de diferenciação mais elevado (G2/G3), receptores de estrogénios (RE) negativos, receptores de progesterona (RP) negativos e sobre-expressão de HER2. A associação foi estatisticamente significativa para o aumento da expressão do HER2 na presença dos genótipos *CC* (OR=2,36; IC95%=1,05-5,33; p=0,03) ou *AA* (OR=3,53; IC95%=1,56-7,99; p=0,001) e para a ocorrência de estádios mais avançados em homozigóticas *AA* (p=0,007).

Relativamente ao número de repetições $(TTTA)_n$, observou-se que o alelo $(TTTA)_{11}$ se associou a tumores em estádios mais avançados (OR=1,85; IC95%=1,05-3,69; p=0,036) mas com RE positivos (OR=2,21, IC95%=1,18-4,14; p=0,009). Os genótipos homozigóticos ou heterozigóticos para o $(TTTA)_{11}$ associaram-se a tumores bem diferenciados (G1) (p=0,009) enquanto que os genótipos com dois alelos $(TTTA)_7$ se associaram a tumores com grau de diferenciação mais elevado (p=0,04), RE negativos (p=0,04) e sobre-expressão de HER2 (p=0,002).

Verificou-se a existência de desequilíbrio de ligação alélica entre os três polimorfismos: alelos *T* e *G* e $(TTTA)_{>7}$ ($p < 0,000006$) e os alelos *C* e *A* e $(TTTA)_{>7}$ ($p < 0,000002$).

Em conclusão, na nossa população, para o gene *CYP19*, verificou-se uma tendência para associação entre os genótipos *TT* e *GG*, quer com o aumento da susceptibilidade para o cancro da mama, quer com um perfil hiper-estrogénico no grupo de mulheres doentes. O polimorfismo $(TTTA)_n$ com dois alelos com número de repetições ≥ 10 associou-se a um aumento de risco de cancro da mama estatisticamente significativo. Em mulheres com cancro da mama, os genótipos *CC*, *AA* e $(TTTA)_{7/7}$ associaram-se a tumores mais agressivos, com receptores hormonais (RH) negativos, grau de diferenciação G2/G3 e sobre-expressão de HER2. Parecem existir genótipos diferentes associados ao cancro da mama, em que uns determinam a susceptibilidade à doença e outros a sua agressividade, sendo esta última mais influenciada por estes polimorfismos.

Abstract

Breast cancer risk is related to a prolonged exposure to sex hormones, whose circulating levels are directly related to the risk of breast cancer in postmenopausal women. In postmenopausal women, estrogens are synthesized in peripheral tissues, such as subcutaneous fat. The final stage of estrogen synthesis is catalysed by the aromatase enzyme that turns androgens into estrogens. Aromatase enzyme is encoded by *CYP19* gene, a member of cytochrome P450 family, localised on the long arm of chromosome 15 (15q21.1).

Several studies suggested a relationship between *CYP19* polymorphisms and breast cancer risk: a tetranucleotide repeat polymorphism in intron 4, $(TTTA)_n$, was associated with an increased risk of breast cancer in longer repeats carriers; a single nucleotide polymorphism (SNP) in the 3' untranslated region of *CYP19* gene, with C to T substitution in exon 10 (*CYP19* $C^{1558}-T$), was found to be associated with breast cancer risk and higher levels of endogenous sex hormones (estradiol); the polymorphism *CYP19* $G>A$, a synonymous SNP with silent variation in exon 3 was related to breast cancer. However, these studies have generated inconsistent and controversial results.

The aim of our study was to examine the effect of three *CYP19* polymorphisms on breast cancer susceptibility and prognosis, and to evaluate their association with sex hormones levels in postmenopausal women. We studied three *CYP19* polymorphisms: the STR *CYP19* $(TTTA)_n$ and the SNPs *CYP19* $C^{1558}-T$ and *CYP19* $G>A$; we also assayed the circulating levels of estradiol, estrone, testosterone, androstenedione and sex hormone binding globulin (SHBG).

One hundred and eighty seven women with breast cancer and 133 healthy controls were included on a case-control study. The three *CYP19* polymorphisms were genotyped by capillary electrophoresis in automated DNA sequencing, real time PCR and RFPL, respectively. Circulating levels of estradiol, estrone, testosterone, androstenedione and SHBG were measured by *radioimmunoassay* (RIA).

We found no statistically significant association between breast cancer and the SNPs *CYP19* $C^{1558}T$ and *CYP19* $G>A$ polymorphisms. However, *CYP19* $C^{1558}T$ -TT and *CYP19* $G>A$ -GG carriers showed a trend towards an increase in breast cancer risk (*odds ratio* (OR)=1.49, 95%Confidence Interval (CI)=0.93-2.39; p=0.09 and OR=1.68, CI95%=0.98-2.65, p=0.057, respectively). *CYP19* $(TTTA)_{10}$ allele carriers also showed non significant higher frequencies in breast cancer patients (OR=2.33; CI95%=0.75-7.22, p=0.13). Significant increased risk was found for carriers of two alleles with ≥ 10 repeats [$(TTTA)_{10/11}$; $(TTTA)_{11/11}$ e $(TTTA)_{11/12}$] (OR=1.92, IC95%=1.01-3.59; p=0.04).

Hormonal study was available on 32 patients and 98 controls. Mean estradiol levels were significantly higher on controls ($p=0.002$), as well as mean testosterone levels ($p=0.05$) and mean SHBG levels were lower ($p=0.05$). Estrone and androstenedione mean levels were higher on patients. There was no statistically significant association between hormone levels and *CYP19* polymorphisms. However, *CYP19 C¹⁵⁵⁸T-TT* and *CYP19 G>A-GG* genotypes showed a slight increase in estradiol and estrone levels in breast cancer patients and the *(TTTA)₁₁* allele was strongly associated with lower estrone levels in control group ($p=0.04$).

The stage and tumours' characteristics and their association with different genotypes were analysed. Patients with *CYP19 C¹⁵⁵⁸T-TT* and *CYP19 G >A - GG* genotypes were associated with advanced stages tumours (III and IV). On the other hand, *CYP19 C¹⁵⁵⁸T- CC* and *CYP19 G >A-AA* genotypes were related to a higher degree of differentiation tumours (G2/G3), with negative estrogens and progesterone receptors and with HER2 positive status, the latter with strong statistical significance: genotype *CC* with OR=2.36 (IC95%=1.05-5.33; $p=0.03$) and genotype *AA* with OR=3.53 (IC95%=1.56-7.99; $p=0.001$).

Concerning the tetranucleotide repeat polymorphism *(TTTA)_n*, a significantly increased risk of advanced stage disease and RE positive tumours was found for *(TTTA)₁₁* allele carriers (OR=1.85, IC95%=1.05-3.69, $p=0.036$ and OR=2.21, IC95%=1.18-4.14; $p=0.009$, respectively). Homozygous and heterozygous carriers for *(TTTA)₁₁* showed a statistically significant increase of well differentiated (G1) tumours ($p=0.009$). Homozygous carriers for *(TTTA)₇* showed a statistically significant relation to a higher degree of differentiation tumours ($p=0.04$), with negative estrogens receptors ($p=0.04$) and with HER2 positive status ($p=0.002$).

We have observed the existence of linkage disequilibrium between the three polymorphisms: *T*, *G* and *(TTTA)_{>7}* alleles ($p<0.000006$) and *C*, *A* and *(TTTA)₇* alleles ($p<0.000002$).

In conclusion, we observed a trend towards an increase in breast cancer risk for *CYP19C¹⁵⁵⁸T - TT* and *CYP19 G>A - GG* carriers in our population, as well as a hyperestrogenic profile. *CYP19 (TTTA)_n* carriers of two alleles with ≥ 10 repeats showed a significant increased risk for breast cancer. In breast cancer patients, the *CYP19 G>A-AA*, *CYP19 C¹⁵⁵⁸T-CC* and *(TTTA)_{7/7}* genotypes were associated to more aggressive tumours, with negative hormonal receptors, high grade differentiation degree (G2/G3) and HER2 over-expression. These genotypes are related to breast cancer in different ways, either determining breast cancer susceptibility or its aggressiveness.

I. Introdução

1. Susceptibilidade genética para o cancro da mama

O cancro da mama é uma das principais causas de morte em mulheres entre os 40 e 55 anos de idade, afectando, actualmente, uma em cada nove mulheres⁽¹⁾. É uma doença multifactorial em 90-95% dos casos, para a qual contribuem factores de ordem hormonal, hereditária, comportamental e ambiental^(1,2). A idade, história familiar, antecedentes de patologia benigna da mama, factores endócrinos endógenos, como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade avançada da primeira gestação, obesidade pós-menopausa e exposição a hormonas exógenas são factores de risco reconhecidos que suportam o papel dos estrogénios na etiologia do cancro da mama⁽¹⁾.

Em 10 a 27% dos casos de cancro da mama há história familiar, embora apenas 5-10% estejam relacionados com mutações de elevada penetrância* em genes como o *BRCA1* e *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *CDH1* ou o *STK11*^(3,4,5). Nas restantes mulheres, estarão envolvidas mutações patogénicas de moderada penetrância em genes como o *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1* e *PALB2* ou variantes genéticas de baixa penetrância, denominadas polimorfismos, que em conjunto criam perfis de susceptibilidade genética ao cancro^(4, 5). De facto, verifica-se que a existência de pelo menos um familiar com cancro da mama, duplica o risco em relação à população em geral^(6,7,8).

Os polimorfismos genéticos podem também explicar as respostas individuais à quimioterapia e radioterapia e a variabilidade da manifestação da doença nos casos familiares monogénicos^(9,10).

O conhecimento da susceptibilidade genética, com a identificação de uma população alvo com risco aumentado de cancro da mama, permite a implementação de medidas preventivas: as mulheres portadoras de mutação em genes de elevada penetrância com o *BRCA1* e *BRCA2*, serão incluídas em protocolos de vigilância e de profilaxia química ou cirúrgica já estabelecidos; nas restantes mulheres, a estratificação de acordo com o risco genético, possibilita a individualização do rastreio, melhorando a sua eficiência e permitindo o exercício de medicina personalizada.

*Penetrância: probabilidade de expressão de um determinado genótipo (número de pessoas com o fenótipo/número de pessoas com o genótipo).

2. Marcadores genéticos: os polimorfismos

As variantes genéticas com localizações conhecidas na sequência do DNA têm contribuído de forma significativa para a investigação médica e forense, permitindo identificar diferenças entre indivíduos e susceptibilidade para determinadas doenças^(11, 12). Consideram-se polimorfismos genéticos variantes genéticas que por si só não se associam a patologia e que geralmente apresentam uma frequência $\geq 1\%$ em determinada população⁽¹²⁾.

Os polimorfismos do DNA são classificados em: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR), *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) e *Copy Number Variation* (CNV). Os VNTRs englobam os satélites, minissatélites e microsatélites ou STRs.

A primeira geração de marcadores genéticos utilizada foram os RFLPs, que se baseiam no uso de enzimas de restrição, que digerem sequências de DNA em locais específicos polimórficos, podendo originar sequências de diferentes tamanhos em diferentes indivíduos⁽¹²⁾.

Dos VNTR, os STRs são os mais utilizados e consistem em repetições de sequências de 1 a 10 nucleótidos. Os STRs são altamente polimórficos, com vários alelos numa população, sendo muito informativos em estudos de ligação^(12,13).

Os SNPs consistem na alteração de um único nucleótido por substituição por outro nucleótido⁽¹⁴⁾. São as variações genéticas mais frequentes no genoma humano, particularmente úteis no estudo de genética das populações e com grande potencial para identificação de genes de susceptibilidade para doenças complexas, nomeadamente nos estudos de microarrays⁽¹²⁾.

Os CNVs consistem em variações genómicas estruturais quantitativas (delecção, duplicação/multiplicação) compostas por segmentos longos de DNA que variam de 1 kilobase (kb) até várias megabases (mb), englobando um ou vários genes, com possíveis implicações funcionais. São os marcadores genéticos mais recentemente descobertos, com elevado potencial no estudo de doenças/fenótipos complexos, podendo ser os marcadores genéticos do futuro^(12,15,16).

A localização e o tipo de polimorfismo determinam a existência ou não de diferenças na função e expressão das proteínas e dos fenótipos. Podem estar localizados na sequência codificante, alterando a função e/ou propriedades das proteínas, nas regiões reguladoras 5'UTR e 3'UTR, com interferência no nível da expressão do gene, nos limites dos locais de *splicing* e em regiões não codificantes. Os polimorfismos localizados nos intrões e outras regiões não codificantes podem influenciar a expressão genética ao interferir com a estabilidade do mRNA⁽¹⁷⁾. Os polimorfismos da região promotora podem interferir com a regulação da transcrição génica.

Por vezes têm sido descritas associações entre polimorfismos não funcionais e determinadas patologias. Pensa-se que estes polimorfismos estejam em desequilíbrio de ligação* com *loci* funcionais próximos, constituindo verdadeiros marcadores da sua presença.

A estratégia para a identificação molecular dos marcadores de predisposição genética para o cancro da mama depende da penetrância dos genes. Os estudos de ligação são utilizados no estudo de mapeamento de genes de elevada penetrância, com um modo de transmissão simples, mendeliano. Estas mutações surgem em famílias em que a maioria de indivíduos afectados é portador da mutação⁽⁴⁾. Os estudos de ligação têm pouco poder estatístico para detectar marcadores de baixa ou moderada penetrância, como os polimorfismos, para os quais são mais adequados os estudos de associação (estudos de caso-controlo).

Os estudos de associação consistem na comparação da frequência de uma variante específica (alélica ou genotípica) entre casos e controlos. Na metodologia do gene candidato selecciona-se um gene para estudo, por estar relacionado com a etiopatogenia da doença, ou por estar posicionado num *locus* previamente relacionado com a doença através de estudos de ligação^(4,6,17,18). Avanços tecnológicos recentes, com o recurso aos microarrays, permitem a análise de centenas a milhares de SNPs em estudos de associação (*Genome-wide association studies*), fornecendo a base para identificação de alelos de risco baixo/moderado sem o prévio conhecimento da sua posição ou função^(8,19).

Com o Projecto do Genoma Humano, que foi concluído em 2003 e o *International HapMap Project* (2005), os investigadores têm actualmente novas ferramentas para avaliação da contribuição genética em doenças comuns.

Vários genes polimórficos de baixa penetrância parecem estar envolvidos na susceptibilidade para o cancro da mama: oncogenes (*HRAS-1*), genes de supressão tumoral (*TP53*), genes envolvidos no metabolismo das hormonas esteróides e transdução de sinal (*CYP1A1*, *CYP17*, *CYP19*, *COMT*, *RE* e *RP*), genes envolvidos no controlo do ciclo celular (*PHB*, *HER2*, *CCDN1*), genes envolvidos no metabolismo de carcinogénios (*SULT1A1*, *NQO1*, *GSTs*), genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP2D6*, *CYP2E1* e *NAT2*) e genes de reparação do DNA (*XRCC1*, *XRCC3*)^(2,3,5,20). Os genes envolvidos no metabolismo das hormonas sexuais são fortes candidatos a genes de susceptibilidade para o cancro da mama, em especial os genes envolvidos na biossíntese do estradiol (*CYP17*, *CYP19* e 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase)^(3,21,22).

*Desequilíbrio de ligação alélica: associação de dois ou mais alelos específicos presentes em diferentes *loci* do mesmo cromossoma; estes alelos são transmitidos habitualmente em conjunto, tornando possível a genotipagem de apenas alguns SNPs, fornecendo informação suficiente para inferir sobre os restantes SNPs da mesma região cromossómica.

Os polimorfismos do gene *CYP19* podem influenciar a actividade da aromatase, não só nos tecidos onde habitualmente se processa a síntese de estrogénios, mas também no próprio tecido mamário, interferindo com a produção local e periférica de estrogénios e, consequentemente, com os seus níveis tissulares e séricos.

3. Estrogénios e cancro da mama

Os estrogénios estimulam a divisão celular e têm um papel bem estabelecido na carcinogénese mamária, onde actuam como iniciadores e como promotores do processo neoplásico⁽²²⁻²⁵⁾.

Nas mulheres pós-menopáusicas, os níveis circulantes das hormonas esteróides sexuais (estrogénios, androgénios e seus precursores) estão relacionados com o risco de cancro da mama, em especial os níveis elevados de estrogénios^(26,27). Factores endócrinos como a obesidade são responsáveis pelo excesso de produção de estrogénios a partir da aromatização dos androgénios no tecido adiposo^(23,28).

São múltiplos os mecanismos que influenciam a exposição dos tecidos aos estrogénios: a elevação dos níveis séricos, o aumento da produção local por actividade da aromatase a partir de precursores androgénicos, a actividade dos receptores hormonais e a alteração do catabolismo, com produção de metabólitos com actividade estrogénica ou genotóxica. O risco desta exposição é cumulativo ao longo da vida^(28,30).

Os estrogénios difundem-se passivamente para o interior das células, ligam-se aos receptores de estrogénios (RE), activando-os. Os receptores activados sofrem alterações conformacionais, migram para o núcleo, dimerizam e autofosforilam-se. Os dímeros activados ligam-se a sequências de DNA (elemento de resposta) em regiões promotoras de genes alvo envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celulares (figura 1)⁽⁵⁾.

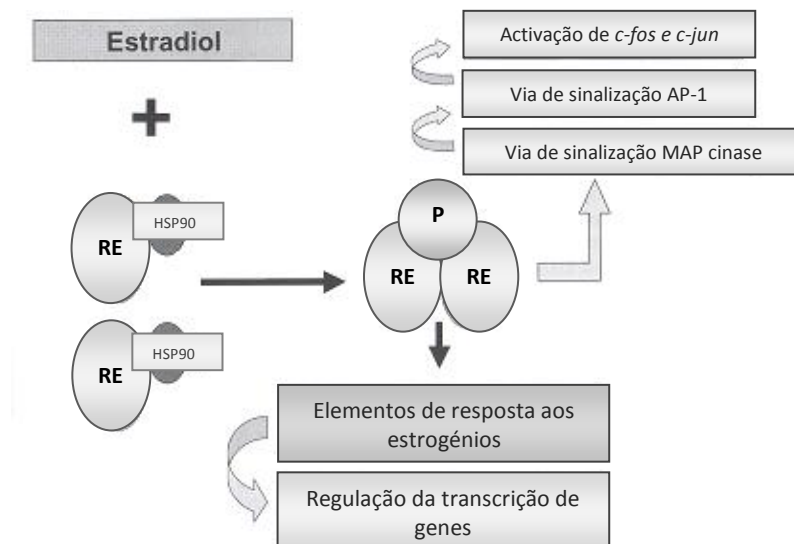


Figura 1: activação dos RE pelo estradiol e vias de sinalização; após ligação ao estrogénios, o RE dissocia-se da proteína HSP90 (inactivadora), activa-se e sofre alteração conformacional, dimeriza e autofosforila; da ligação às regiões promotoras de genes alvo, resulta a activação da transcrição desses genes e activação de vias de sinalização. AP-1: proteína activadora 1; MAP: mitogen activated protein (retirado de Brewster *et al.*, 2005)⁽⁵⁾.

Os estrogénios promovem a activação de oncogenes como o *c-myc*, *c-fos* e *c-jun*, conduzindo à estimulação da proliferação das células tumorais da mama. Inibem ainda a apoptose das células neoplásicas^(5,20,28,30).

Os produtos do metabolismo oxidativo dos estrogénios, em especial os catecol-estrogénios, constituem uma fracção carcinogénica e genotóxica, em especial a fracção 4OH, mediante a formação de compostos que vão conduzir a lesão oxidativa do DNA^(20,24,31). A enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) é uma das enzimas que participa na regulação desta via metabólica, inactivando os 4-hidroxiestrogénios^(20,24,31).

4. Outras hormonas sexuais endógenas e cancro da mama

A exposição a níveis elevados de hormonas sexuais, incluindo estrogénios, androgénios, e seus precursores está associada a um risco aumentado de cancro da mama^(24,26,31). Numa análise de nove estudos prospectivos, Key TJ *et al.* (*the endogenous hormones and breast cancer collaborative group*, 2002⁽²⁶⁾) verificaram um risco elevado de cancro da mama com o aumento das concentrações séricas de estradiol total e livre, estrona, sulfato de estrona, androstenediona, testosterona e sulfato de dehidroepiandrosterona em mulheres pós-

menopáusicas, sendo o aumento do risco progressivo com a elevação das concentrações séricas e a sua magnitude semelhante para estrogénios e androgénios.

Os androgénios, em especial a testosterona e a androstenediona, estão associados ao risco de cancro da mama nas mulheres pós-menopáusicas por constituírem substrato para a síntese de estrogénios por aromatização periférica (nomeadamente na mama) mas também directamente por estimulação do crescimento e divisão celular^(25,26).

Os níveis de SHBG estão associados a uma diminuição do risco de cancro da mama^(26,31). A SHBG, proteína transportadora das hormonas sexuais, regula os níveis circulantes destas hormonas, restringindo a sua passagem através da membrana celular, limitando, desta forma, a sua actividade biológica⁽³¹⁾.

Outra hormona que tem sido associada ao cancro da mama é a progesterona. No entanto, o seu papel na carcinogénese mamária permanece mal definido, não havendo nenhum perfil molecular tumoral associado à resposta à terapêutica com progesterona ou seus antagonistas, de forma inequívoca. Os metabólitos da progesterona derivados da 5 α -reductase, poderão estar envolvidos nesta carcinogénese pois têm um efeito mitogénico no tecido mamário, inibem a apoptose e a adesão celular⁽³²⁾.

5. Actividade da aromatase

Na pré-menopausa, os estrogénios são produzidos essencialmente nos ovários. Após a menopausa, a produção de estrogénios é efectuada a nível periférico, constituindo o tecido adiposo, a pele, os músculos e o fígado as principais fontes de estrogénios, através da conversão local dos androgénios em estrogénios^(24,25,33).

A enzima aromatase pertence ao citocromo P450 e catalisa a conversão dos androgénios em estrogénios, sendo uma enzima chave na biossíntese dos estrogénios (figura 2).

A actividade da aromatase determina o nível de estrogénios circulantes e locais. A aromatase está presente no retículo endoplasmático das células de vários tecidos, incluindo células da granulosa e corpo amarelo, células de Leydig dos testículos, placenta, cérebro, tecido adiposo, mama e osso. As diferentes formas de estrogénios são sintetizadas a partir de diferentes substratos androgénicos, consoante os tecidos^(25,34-36). Há promotores tissulares específicos da expressão do gene da aromatase com diferente actividade na produção local de estrogénios^(25,33).

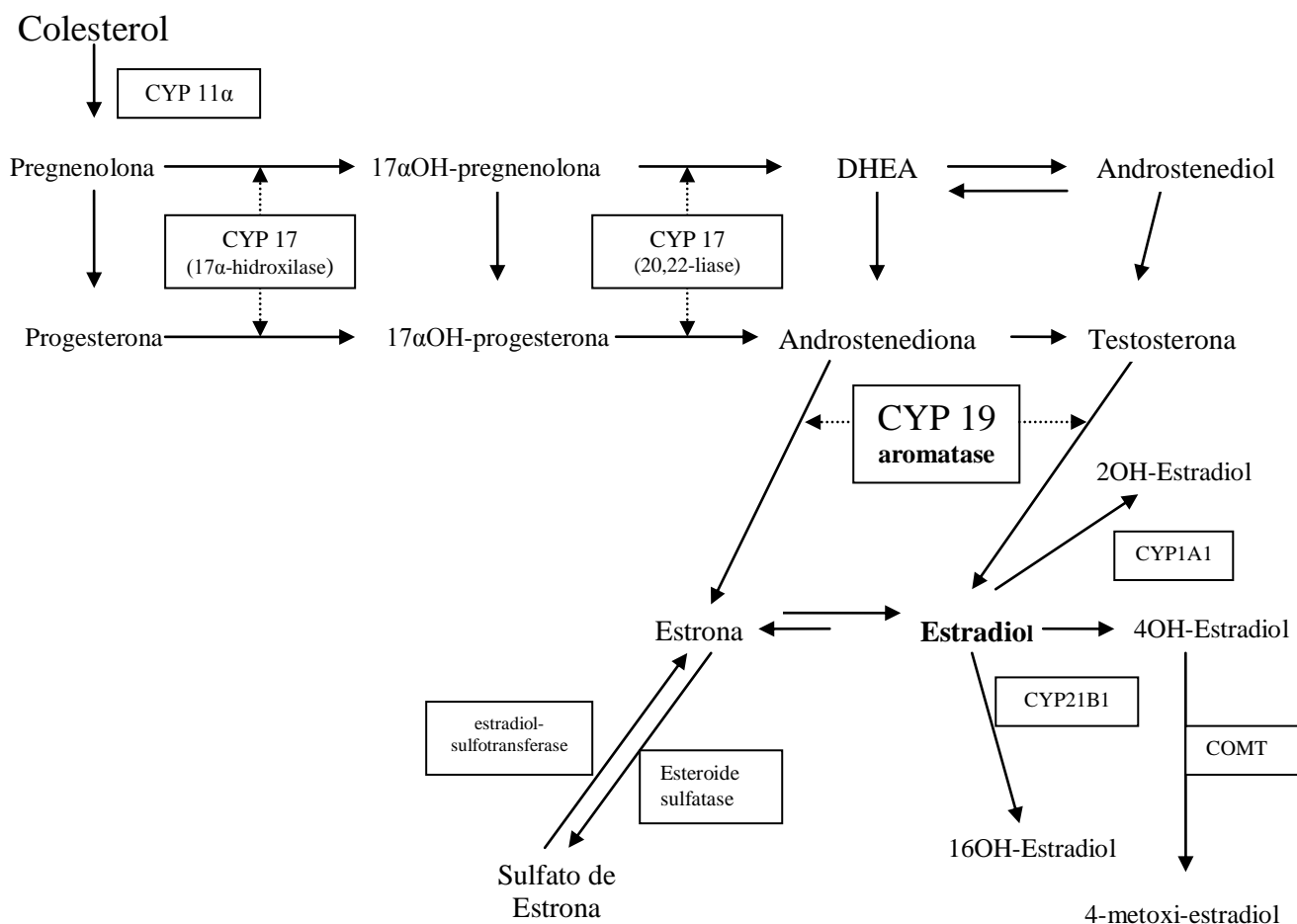


Figura 2: Via metabólica das hormonas esteróides sexuais (retirado e adaptado de Kristensen et al.⁽²⁰⁾ e Dunning et al.⁽³¹⁾).

As alterações na expressão da aromatase têm sido implicadas na patogénese de várias doenças estrogénio-dependentes, como o cancro da mama, o cancro do endométrio, a endometriose e a osteoporose⁽³⁷⁾.

Alguns estudos demonstraram a existência de síntese de estrogénios *in situ* nas células do cancro da mama, associada a elevada actividade da aromatase local^(38,39). Este fenómeno pode ocorrer por utilização preferencial do promotor específico do ovário em detrimento do promotor do tecido mamário, com conseqüente elevação da expressão do mRNA da aromatase, implicando a regulação transcripcional do *CYP19* no desenvolvimento e progressão do cancro da mama^(25,38-41). A aromatase poderá também actuar como factor de crescimento nas células tumorais, conforme demonstrado em estudos de linhas celulares⁽²⁵⁾.

A importância da aromatase está demonstrada na prática clínica com a utilização dos inibidores da aromatase no tratamento das mulheres pós-menopausa com cancro da mama com receptores de estrogénios positivos^(37,42).

6. Polimorfismos do gene *CYP19*

A enzima aromatase é codificada pelo gene *CYP19*, localizado no braço longo do cromossoma 15 (15q21.1). Este gene é constituído por 123 kb, incluindo 30 kb com exões codificantes (exões 2 a 10) e uma região de 93 kb na terminação 5', que serve de unidade reguladora do gene, com 10 exões não codificantes com especificidade tissular, regulados por promotores específicos que controlam a transcrição em diferentes células e tecidos^(20,25,37,41,43). O tecido adiposo mamário normal tem níveis baixos de expressão da aromatase, regulada pelo promotor I.4. No cancro da mama, os principais promotores envolvidos na regulação da expressão da aromatase são o II, I.3, o I.7 e I.4⁽²⁵⁾.

O gene *CYP19* tem mais de cem polimorfismos de nucleótido único (*SNP*) estudados^(37,43). A estrutura do gene *CYP19* está esquematizada na figura 3.

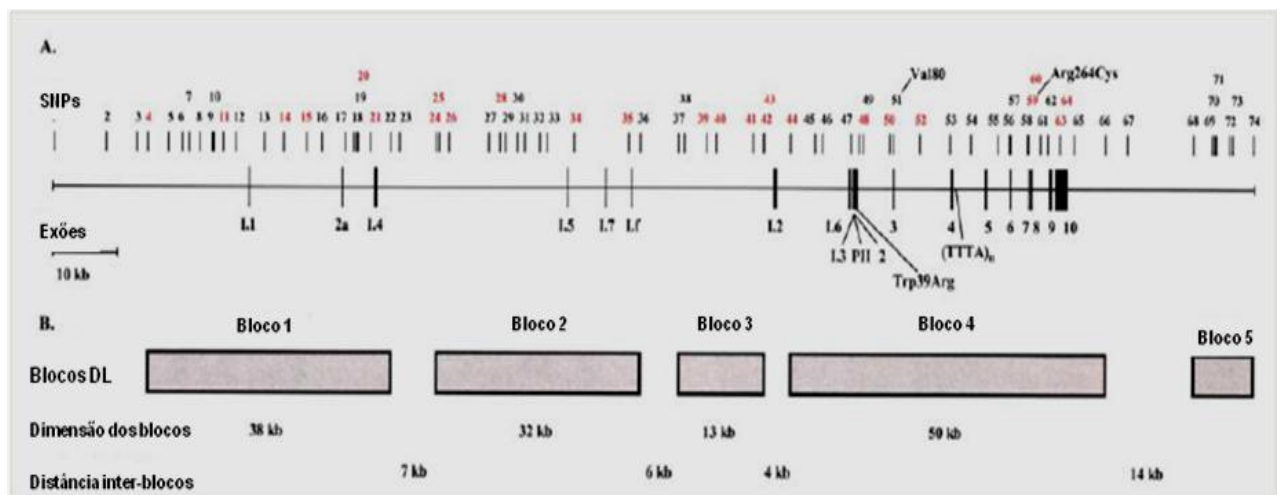


Figura 3: organização genómica do *CYP19*; A: 74 SNPs analisados; B: blocos (segmentos genómicos) com SNPs com elevado grau de desequilíbrio de ligação (DL) entre eles (retirado e adaptado de Haiman *et al.*)⁽³⁶⁾

Alguns estudos sugerem que os polimorfismos do gene *CYP19* têm o potencial de alterar a expressão deste gene, quer ao nível da actividade da aromatase quer por alteração dos promotores tissulares, afectando a actividade esteróide sexual⁽⁴⁰⁾. A expressão da actividade da aromatase nas células com transformação neoplásica poderá estar relacionada com esta regulação, havendo variações genéticas associadas a um genótipo de alto risco.

O polimorfismo do *CYP19* mais estudado é o polimorfismo por repetição do tetranucleótido $(TTTA)_n$. Identificado por Polymeropoulos *et al.*⁽⁴⁴⁾ localiza-se no intrão 4 do gene *CYP19* e contém um número variável de repetições (entre 7 e 13). Um número elevado de repetições [$(TTTA)_{\geq 10}$] foi associado a um aumento da actividade da aromatase^(34,45-47).

Há múltiplos estudos que relacionam alelos com diferentes repetições $(TTTA)_n$ com o cancro da mama. Kristensen *et al.*⁽⁴⁸⁾ descreveram a associação do polimorfismo $(TTTA)_{12}$ com risco de cancro da mama (OR=2,42, IC95%=1,03-5,80). Haiman *et al.*⁽⁴⁵⁾, observaram uma associação significativa do alelo $(TTTA)_{10}$ com o cancro da mama (p=0,005; OR=2,87, IC95%=1,20-6,87). Verificaram ainda que o alelo $(TTTA)_{10}$ estava associado a tumores em estádios mais avançados, com envolvimento glandular e/ou metastização à distância.

Kristensen *et al.*⁽²⁰⁾ sugerem que o alelo $(TTTA)_{10}$ poderá também ser responsável por um aumento de transcrição do promotor tissular de ovário, condicionando níveis mais elevados de mRNA do *CYP19*. Baxter *et al.*⁽⁴⁶⁾ e Haiman *et al.*⁽³⁶⁾ sugerem que, devido à sua localização intrónica, este polimorfismo de repetição não tenha significado funcional mas seja um marcador de risco por estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais do *CYP19*.

O polimorfismo *CYP19* C¹⁵⁵⁸-T (rs10046) é um SNP com variação C¹⁵⁵⁸T localizado no exão 10, na região 3' não traduzida (3'UTR)⁽⁴⁹⁾. A variante TT foi associada ao cancro da mama, a um perfil hiper-estrogénico e a elevação do mRNA da aromatase no cancro da mama^(31,40,47). Kristensen *et al.*⁽⁴⁰⁾ descreveram a associação da variante TT com cancro da mama (OR=1,51; IC95%=1,04-2,16), com o aumento do mRNA da aromatase nos tumores (p=0,018) e com a prevalência do promotor específico do ovário (p=0,004). Dunning *et al.*⁽³¹⁾, observaram a associação estatisticamente significativa da variante CC com níveis séricos reduzidos de estradiol (p=0,0006), de estrona (p=0,004), da relação estradiol/testosterona (0,000001), estrona/androstenediona (0,002) e estradiol/SHBG (0,02). Está descrito um forte desequilíbrio de ligação entre este polimorfismo e o polimorfismo por repetição do tetranucleótido $(TTTA)_n$, entre o alelo C e o $(TTTA)_7$ ⁽⁴⁰⁾.

O Polimorfismo *CYP19* G>A (rs700518) é um polimorfismo silencioso do gene *CYP19* localizado no exão 3 com variação G >A, Val80, observado pela primeira vez por Sourdaine *et*

al.⁽⁵⁰⁾ em tecido tumoral de cancro da mama. A variante *AA* foi associada a uma elevação basal da actividade da aromatase e a aumento do risco de cancro da mama⁽⁵¹⁾. Somner *et al.*⁽³⁵⁾ descreveram a associação entre este genótipo (*AA*) e níveis séricos basais de estradiol significativamente mais elevados ($p=0,04$), em mulheres pós-menopáusicas, em comparação com os genótipos *GG* e *GA*⁽³⁵⁾.

Haiman *et al.*⁽⁴³⁾, num estudo multicêntrico que envolveu cinco estudos prospectivos caso-controlo, com um total de 5.356 mulheres com cancro da mama invasivo e 7.129 controlos, avaliaram a variação genética ao longo de todo o *locus CYP19A1* (103 polimorfismos SNP) em relação com o cancro da mama e os níveis séricos de hormonas esteróides em mulheres pós-menopausa. Identificaram oito SNP (rs749292, CV8234971, rs1008805, rs727479, rs2414096, rs10046 (*CYP19 C¹⁵⁵⁸T*), rs4646) associados de forma estatisticamente significativa aos níveis de estrogénios circulantes em mulheres pós-menopáusicas (aumento de 10-20% dos níveis de estrogénios circulantes) embora sem associação significativa com cancro da mama.

Os múltiplos estudos que analisaram a possível associação dos diferentes polimorfismos do *CYP19* com o cancro da mama têm apresentado resultados inconsistentes e pouco reprodutíveis. Este problema parece estar relacionado com a dificuldade em avaliar os efeitos destes genes, de baixa penetrância, tendo em conta o carácter multifactorial do cancro da mama com uma enorme multiplicidade de factores envolvidos na sua patogénese^(29,42).

Não há nenhum estudo publicado sobre estes polimorfismos na população portuguesa.

Na tabela I estão representados os principais estudos que avaliaram os diferentes polimorfismos do *CYP19* e a sua relação com o cancro da mama.

Tabela I: referências bibliográficas relativas a estudos de associação entre diferentes polimorfismos do *CYP19* e o cancro da mama (CM)

Polimorfismo <i>CYP19</i>	Genótipo	Efeito	Referências
<i>CYP19</i> G>A	AA	CM (p=0,019) • maior incidência familiar • idade precoce de diagnóstico	Siegelmann-Danieli <i>et al.</i> (1998) ⁽⁵¹⁾
		elevação dos níveis de estradiol (p=0,04)	Somner <i>et al.</i> (2004) ⁽³⁵⁾
		sem relação demonstrada com CM	Miyoshi <i>et al.</i> (2000) ⁽⁵²⁾ Olson <i>et al.</i> (2007) ⁽⁴²⁾
<i>CYP19</i> C ¹⁵⁵⁸ -T	TT	frequência elevada em: • mulheres com CM (p=0,007) • estádios avançados (p=0,004) • tumores >5cm (p=0,001) associação entre o alelo T e os níveis de mRNA aromatase	Kristensen <i>et al.</i> (2000) ⁽⁴⁰⁾
		variações dos níveis hormonais: • estradiol (TT p=0,0006, CT p=0,0003) • Relação estradiol/testosterona	Dunning <i>et al.</i> (2004) ⁽³¹⁾ Haiman <i>et al.</i> (2007) ⁽⁴³⁾
		sem relação demonstrada com CM	Olson <i>et al.</i> (2007) ⁽⁴²⁾
		associação com risco CM OR=1,73 (1,13-2,65; CI 95%) Risco de CM pré-menopausa OR=1,78 (1,03-3,09; CI 95%) Associação com ERα - CC	Zhanget <i>et al.</i> (2009) ⁽⁵³⁾
<i>CYP19</i> (TTTA) <i>n</i>	(TTTA)12	3,6 vs. 1,6 (CM vs controlo) OR=2,42 (1,03-5,8; CI 95%) OR=1,49 (0,86-2,56; CI 95%) <i>NS</i> <i>NS</i>	Kristensen <i>et al.</i> (1998) ⁽⁴⁸⁾ Haiman <i>et al.</i> (2000) ⁽⁴⁵⁾ Baxter <i>et al.</i> (2001) ⁽⁴⁶⁾
	(TTTA)11	Associação <i>NS</i> com risco de CM em famílias com registo de CM Risco de CM em filhas de portadoras deste alelo (exposição estrogénica <i>in utero</i> ?)	Ahsan <i>et al.</i> (2005) ⁽²⁹⁾
	(TTTA)10	2,3% vs 0,7%, p=0,005 (CM vs controlo) OR=3,08 (1,35-7,01, CI 95%) 1,5% vs 0,2%, p=0,028 (CM vs controlo)	Haiman <i>et al.</i> (2000) ⁽⁴⁵⁾ Baxter <i>et al.</i> (2001) ⁽⁴⁶⁾
	(TTTA)≥10	OR=1,8 (0,97-3,36; CI 95%) OR=1,29 (0,83-2,00; CI 95%) <i>NS</i>	Miyoshi <i>et al.</i> (2000) ⁽⁵²⁾ Okobia <i>et al.</i> (2006) ⁽⁵⁴⁾
	(TTTA)8	13,5% vs 8,7%, p=0,02 (CM vs controlo) alterações ligeiras dos níveis de estradiol, estrona e relação E2/E3 apenas com (TTTA) 7 e 8 sem relação com CM	Baxter <i>et al.</i> (2001) ⁽⁴⁶⁾ Haiman <i>et al.</i> (2000) ⁽⁴⁵⁾
	(TTTA)7	Risco de CM, p=0,19 Risco de CM RE+ OR=1,72 (1,1-2,69; CI 95%), p<0,005	Siegelmann-Danieli <i>et al.</i> (1998) ⁽⁵¹⁾ Miyoshi <i>et al.</i> (2003) ⁽⁵⁷⁾
	(TTTA) <i>n</i>	Ausência de relação de variações polimórficas com CM	Suspitsin <i>et al.</i> (2002) ⁽²⁾ Olson <i>et al.</i> (2007) ⁽⁴¹⁾
Outros polimorfismos	<i>CYP19</i> Codão 39 (Trp-Arg)	Baixo risco de CM (variante Arg) Sem evidência de relação com baixo risco	Miyoshi <i>et al.</i> (2000) ⁽⁵²⁾ Haiman <i>et al.</i> (2003) ⁽³⁶⁾
	<i>Rs1008805</i> GA (exão 2)	Elevação dos níveis séricos de estradiol e estrona	Haiman <i>et al.</i> (2007) ⁽⁴³⁾
	GG/GA	OR=1,72 (1,20-2,49, CI95%) em mulheres pré-menopausa CM RE/RP negativos	Talbott <i>et al.</i> (2008) ⁽⁵⁵⁾

II. Objectivos

Os objectivos deste trabalho são:

- Avaliar a associação dos polimorfismos do gene *CYP19* [*CYP19 C¹⁵⁵⁸T*, *CYP19 G>A* e *(TTTA)_n*] e a susceptibilidade para o cancro da mama, em mulheres pós-menopáusicas;
- Avaliar a associação destes polimorfismos com a agressividade e prognóstico do cancro da mama;
- Correlacionar estes polimorfismos com os níveis séricos hormonais de estradiol, estrona, testosterona, androstenediona e SHBG;
- Estudar as frequências genotípicas e alélicas destes polimorfismos na população portuguesa;
- Verificar a existência de desequilíbrio de ligação alélica entre os três polimorfismos.

O objectivo principal foi a identificação de marcadores de susceptibilidade e de prognóstico do cancro da mama.

III. Material e Métodos

Este projecto foi desenvolvido no âmbito do CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia) que aprovou e financiou a sua execução (projecto nº 10/05) e decorreu nas seguintes instituições: serviços de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) e Maternidade Bissaya Barreto (MBB), serviço de Ginecologia/Obstetrícia do Hospital Infante D. Pedro, EPE (HIP), de Aveiro, serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e serviço de Patologia Clínica - Laboratório de Hormonologia e Monitorização de Fármacos dos HUC.

1. População

Foram estudadas 187 mulheres com cancro da mama e 133 mulheres sem patologia maligna, seguidas em consultas de rotina ou portadoras de patologia ginecológica benigna que constituíram o grupo controlo. Todas as mulheres eram de raça caucasiana e pós-menopáusicas.

O recrutamento teve início em Maio de 2005 e terminou em Junho de 2006, através da consulta externa e unidades de internamento dos serviços de ginecologia dos HUC e da MBB e do serviço de ginecologia/obstetrícia do HIP. Consistiu no preenchimento de um inquérito com colheita de dados relativos à história ginecológica e obstétrica, hábitos tabágicos, parâmetros biométricos (altura, peso e IMC) e na colheita 20ml de sangue para estudo genético e hormonal.

A história ginecológica e obstétrica incluiu a idade da menarca, paridade, idade do primeiro parto, amamentação, uso de hormonas exógenas (contraceptivos hormonais ou terapêutica hormonal) e idade da menopausa. A menopausa foi definida como mais de um ano de amenorreia, duas determinações de FSH superiores 35mIU/ml com estradiol <20-30pg/ml, menopausa cirúrgica ou idade superior a 51 anos. Considerou-se como tendo história familiar de cancro da mama, as mulheres com antecedentes de pelo menos um familiar em primeiro grau com cancro da mama (mãe, irmã ou filha). Foram excluídas mulheres com mutações dos genes *BRCA1* /*BRCA2*. O IMC foi calculado de acordo com a fórmula peso/altura².

Nas mulheres com cancro da mama foram avaliados o estágio da doença e as características histopatológicas do tumor, como o tipo histológico, grau de diferenciação, presença de receptores de estrogénios e de progesterona e HER2.

Este estudo foi aprovado pelas comissões de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e do HIP.

Todas as mulheres incluídas participaram de forma voluntária e deram o consentimento informado para a participação neste estudo.

2. Caracterização genotípica

2.1. Extracção do DNA

A extracção do DNA iniciou-se a partir de colheita de 10 ml de sangue periférico a cada doente, em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético dissódico (Na₂EDTA) e armazenado de imediato a uma temperatura de -20°C.

Para o isolamento do DNA recorreu-se ao método da ureia, adaptando a técnica previamente descrita (Miller *et al.*⁽⁵⁶⁾): após descongelamento, a amostra de sangue foi tratada com 40ml de um tampão de lise de eritrócitos constituída por PBS 1x com 0,1% de IGEPAL. Esta solução promove a lise de eritrócitos e a libertação de hemoglobina. As amostras foram posteriormente colocadas num agitador automático durante 10min e, de seguida, centrifugou-se a suspensão durante 20min a 2500rpm. Desperdiçou-se o sobrenadante por aspiração e ressuspendeu-se novamente o sedimento em 40ml da mesma solução de lise de eritrócitos, repetindo-se este procedimento até à obtenção de sobrenadantes límpidos, com remoção completa da hemoglobina.

O sedimento resultante foi ressuspenso em 1 a 6ml de um tampão de lise de membranas constituído por NaCl 300mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 10mM, pH 7,4, ureia 7M até completa homogeneização. Adicionou-se SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), num volume correspondente a 1/5 do volume do homogeneizado.

Esta mistura foi deixada a incubar, durante 8 horas, a 37°C com agitação constante a 100rpm no Shaker (Forma Orbital Shaker, Thermo).

Para precipitação das proteínas, adicionou-se uma solução de NaCl 6mM na proporção de 1ml para 3,5ml da amostra, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se durante 25min a 3500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido e o DNA foi precipitado com a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto. Removeu-se o novelo de DNA com

uma pipeta e lavou-se com etanol a 70%. Após evaporação do etanol, o DNA foi dissolvido em 200µl de água bidestilada e incubado a 65°C durante 30min para inativação de DNases e RNases. As amostras foram conservadas a -20°C até utilização.

2.2. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA e a avaliação do grau de pureza da amostra foram efectuadas por espectrofotometria, com leitura das absorvâncias a comprimentos de onda de 260nm e 280nm.

2.3. Estudo do Polimorfismo *CYP19 C^{1558T}*

O polimorfismo *CYP19 C^{1558T}*, localizado no exão 10, na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene, foi estudado por PCR em tempo real com sondas Taqman.

As sondas Taqman são específicas para uma determinada sequência nucleotídica. Na posição 5' são marcadas fluorimetricamente com uma molécula *reporter* e na posição 3' com uma molécula *quencher*. Enquanto a sonda Taqman mantiver a sua estrutura intacta e as duas moléculas, *reporter* e *quencher*, estiverem próximas não há emissão de fluorescência. Quando a sonda reconhece um alelo e hibridiza, ela é degradada pela DNA polimerase no processo de síntese da nova cadeia durante a fase de extensão da PCR, emitindo então fluorescência (figura 4).

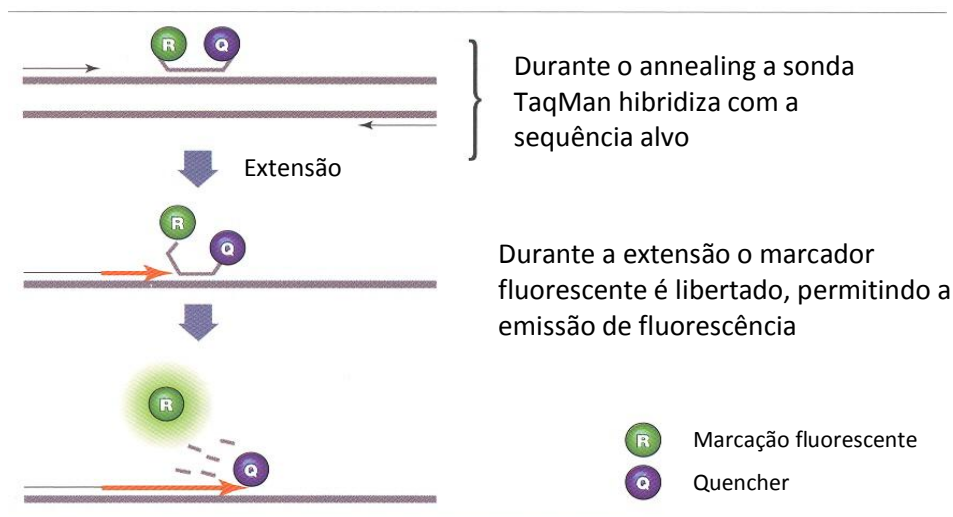


Figura 4- Actuação de sonda TaqMan (retirado e adaptado de *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen))

Para os ensaios de PCR em tempo real, usou-se o primer proximal TTG AGA GCA TAC AGA AGA TAC, o primer distal TGT ATG TGA ACT ACT GAT GAG, a sonda 6FAM- CTC CAG AGT GGG TAC TGA CC para o alelo C e a sonda TET-CTC CAG AGT AGG TAC TGA CC para o alelo T (figura 5).

A reacção foi efectuada num volume de 20 µl, contendo 200nM de DNA, 1 x *master mix* (iQtm supermix, Biorad), 300 nM de cada *primer* e 200 nM de cada sonda. As amostras foram submetidas 10 min a 95°C, seguidos de 35 ciclos de amplificação com 30 seg a 95°C e 1 minuto a 60°C.

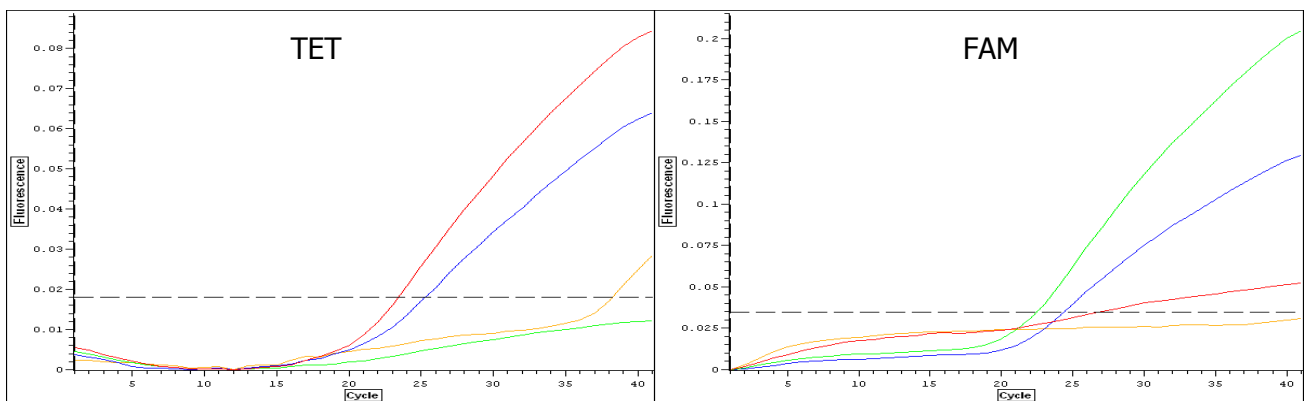
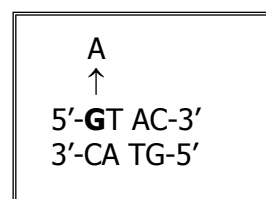


Figura 5: Discriminação alélica do *CYP19 C¹⁵⁵⁸T* por PCR em tempo real: a amostra marcada a verde só amplifica na presença da sonda FAM, correspondendo a homozigotia para alelo C, a amostra marcada a vermelho só amplifica na presença da sonda TET, correspondendo a homozigotia para alelo T e a amostra marcada a azul amplifica na presença das duas sondas correspondendo a heterozigotia.

2.4. Estudo do Polimorfismo *CYP19G>A*

A identificação do polimorfismo sinónimo G>A (valina 80, exão 3) do gene *CYP19* foi realizada por técnica de RFLPs, segundo Somner *et al.* ⁽³⁵⁾. A sequência do primer distal foi alterada num nucleótido (de A para G) junto da terminação 3' de modo a criar um site de restrição para a enzima *RsaI* no alelo predominante (figura 6).

Figura 6: Sequência de restrição da enzima *RsaI*. O polimorfismo G>A elimina o site de restrição.



Os primers usados foram os seguintes: proximal, 5'-AGT AAC ACA GAA CAG TTG CA-3' e distal, 5'-TCC AGA CTC GCA TGA ATT CTC CGT A-3'. Para a amplificação, num volume final de 25 μ l, usaram-se cerca de 200ng de DNA, 2,0 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 0,25 μ M de primers, tampão 1x e 1 unidade de Taq DNA polimerase. Após uma desnaturação prévia de 5 min a 95°C seguem-se 35 ciclos de 1min de desnaturação a 95°C, 1min de emparelhamento a 56°C e 1min de extensão a 72°C, finalizou-se com 5min de extensão a 72°C. As amostras amplificadas foram sujeitas a 6 horas de digestão a 37°C com a enzima de restrição *RsaI* (15 μ l de produto de PCR para 5 unidades de enzima). A amplificação resultou num fragmento de 188 pb e a digestão originou, para o alelo predominante (G), dois fragmentos, de 164 e 24pb. Após electroforese em gel de agarose a 3% (utilizando o marcador de peso molecular Qx) e coloração com brometo de etídeo, o padrão de bandas permitiu distinguir homozigotos e heterozigotos (figura 7). Os resultados foram confirmados pela sequenciação de amostras de homozigotos e heterozigotos.

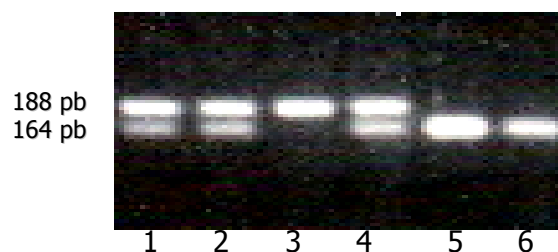


Figura 7: Polimorfismo CYP19 G>A. Electroforograma em gel de agarose após digestão enzimática. As posições 1, 2 e 4 correspondem a heterozigotos; a posição 3 corresponde a homozigotia para o alelo CYP19 A e as posições 5 e 6 correspondem a homozigotia para o alelo CYP19 G. A banda de 24 pb não se visualiza.

2.5. Estudo do Polimorfismo de repetição do tetranucleótido (*TTTA*)_n

A análise do polimorfismo de repetição *CYP19 (TTTA)_n*, foi efectuada pela técnica de análise de fragmentos por electroforese capilar, em sequenciador automático *AbiPrism 3130*. A amplificação foi feita com o primer proximal GTCTATGAATGTGCCTTTTTT, marcado fluorimetricamente em 5' com 6-FAM e com o primer distal GTTTGACTCCGTGAGTTTGA, com uma concentração de 1,5mM de $MgCl_2$, e a uma temperatura de annealing de 58°C. Após confirmação da amplificação das amostras por electroforese em gel de agarose a 1,5%, os produtos foram diluídos (1/7 ou 1/10). A cada 1 μ l de amostra diluída adicionaram-se 0,5 μ l de marcador de peso molecular (*GS500 LIZ*) e 15 μ l de formamida. A mistura foi desnaturada a

95°C durante 3min. e rapidamente colocada sobre gelo por mais 2 a 3min. Seguiu-se a electroforese capilar em sequenciador automático com o polímero POP7.

A confirmação do número de repetições ($(TTTA)_n$) foi efectuada por sequenciação automática (AbiPrism 3130), de algumas amostras de indivíduos homocigóticos para o número de repetições (figuras 8 e 9). Os primers utilizados na sequenciação tinham a mesma composição nucleotídica da análise de fragmentos, exceptuando a marcação com 6-FAM do primer proximal.

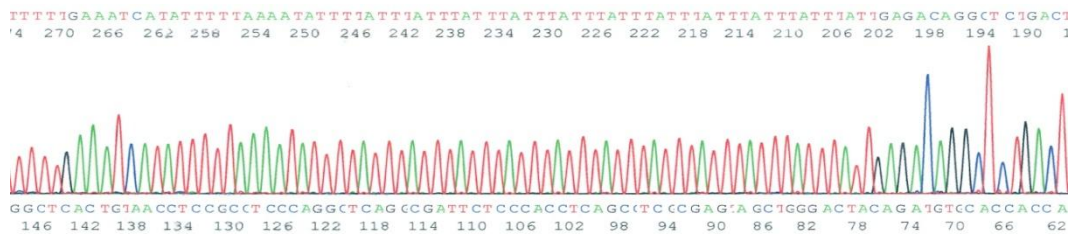


Figura 8: Electroforograma de sequenciação que confirma a existência de 12 repetições $TTTA$ correspondendo a um fragmento de 314pb.

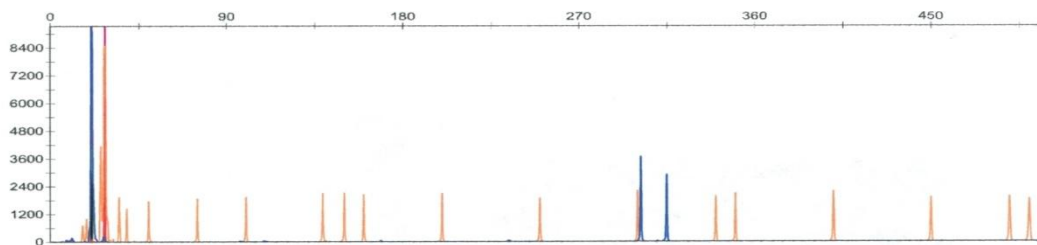


Figura 9: Electroforograma capilar de caracterização do polimorfismo $CYP19 (TTTA)_n$. Amostra de heterocigoto, sendo visíveis a azul dois picos de 302 e 318pb, correspondentes a 9 e 13 repetições, respectivamente. Utilizou-se o marcador "500 LIZ" (picos a laranja).

3. Doseamentos hormonais

Foram efectuados doseamentos séricos de estradiol, estrona, testosterona total, androstenediona e SHBG por RIA (radioimunoassay), a partir de amostras de 10cc de sangue periférico previamente centrifugado e armazenado a 2-8°C.

O estradiol e a testosterona foram determinados usando o sistema ADVIA Centaur E_2-6 e TSTO (Siemens Medical Solutions Diagnostics, USA), respectivamente. A estrona foi medida utilizando o Kit DSL-8700 Estrone RIA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc, USA). A androstenediona foi determinada pelo sistema IMMULITE 2000 Androstenedione (Siemens

Healthcare Diagnostic Products, Ltd, Gwynedd LL55 4EL, UK) e o SHBG foi determinado pelo sistema SHBG IMMULITE 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, USA) Os valores de referência indicados pelo laboratório foram os seguintes: estradiol <14pg/ml e estrona 42,7pg/ml (14,1-102,6pg/ml) em mulheres pós-menopausa; testosterona 0,1-0,9ng/ml e androstenediona 0,5-3,4ng/ml para a população feminina e SHBG 18-114nmol/L.

4. Análise estatística

A análise estatística foi efectuada pelo programa SPSS, versão 16.0. A avaliação de médias e frequências foi efectuada pelo *t teste* ou pelo χ^2 quando apropriado. Considerou-se como estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

O Odds Ratio (OR) foi calculado com um intervalo de confiança de 95%. O desequilíbrio de ligação foi calculado pelo método de Hill.

IV. Resultados

1. Caracterização da população:

Foram estudadas 187 mulheres com cancro da mama e 133 mulheres saudáveis que constituíram o grupo de controlo (excluíram-se 14 mulheres com cancro da mama e 17 mulheres do grupo controlo, nas quais o estudo genético não foi efectuado ou não foi conclusivo). Os doseamentos hormonais foram efectuados num grupo de 32 mulheres com cancro da mama e 98 mulheres do grupo controlo.

As características clínicas da população estudada estão descritas na tabela II.

Tabela II: Características clínicas gerais da população estudada

	<i>Casos</i> (n=187)	<i>Controlos</i> (n=133)	<i>p</i>
Idade [anos; \bar{X} (sd)]	64,2 (8,97)	61,2 (8,37)	0,003
Idade do diagnóstico [anos; \bar{X} (sd)]	59,6 (9,79)	-	-
Idade da menarca			
• ≤10 anos	3 (1,6%)	5 (3,8%)	0,44
• 11-15 anos	165 (88,2%)	113 (84,9%)	
• ≥16 anos	19 (10,2%)	15 (11,3%)	
Paridade			
• 0	19 (10,2%)	8 (6,0%)	0,076
• 1-2	48 (25,7%)	24 (18,1%)	
• ≥ 2	120 (64,1%)	101 (75,9%)	
Idade da primeira gravidez (n=161)		(n=107)	
• ≤25 anos	120 (74,5%)	81 (75,7%)	0,83
• 26-29 anos	31 (19,3%)	18 (16,8%)	
• ≥30 anos	10 (6,2%)	8 (7,5%)	
Amamentação (n=180)		(n=118)	
• Sim	140 (77,8%)	78 (66,1%)	0,03
• Não	40 (22,2%)	40 (33,9%)	
Idade da menopausa			
• <55 anos	174 (93,1%)	121 (91,0%)	0,49
• ≥55 anos	13 (6,9%)	12 (9,0%)	
Índice de massa corporal [Kg/m ² (sd)]	28,6 (4,5)	29,1 (4,5)	0,054
Contraceção hormonal (n=186)		(n=118)	
• Não	124 (67%)	68 (57,6%)	0,095
• <10 anos	30 (16,1%)	31 (26,3%)	
• ≥10 anos	32 (17,2%)	19 (16,1%)	
Terapêutica hormonal			
• Não	141 (75,4%)	85 (63,9%)	0,029
• <10 anos	42 (22,5%)	47 (35,3%)	
• ≥10 anos	4 (2,1%)	1 (0,8%)	
Tabaco			
• Sim	7 (3,7%)	7 (5,3%)	0,51
• Não	180 (96,3%)	126 (94,7%)	
História familiar de cancro da mama (n=186)		(n=131)	
• Sim	36 (19,4%)	26 (19,8%)	0,91
• Não	150 (80,6%)	105 (80,2%)	

\bar{X} : média; sd: desvio padrão

As mulheres com cancro da mama apresentavam uma média de idade ligeiramente superior à do grupo controlo [64,2 (sd=8,97) vs 61,2 (sd=8,37) anos; p=0,003]. A idade média do diagnóstico do cancro da mama foi 59,6 (sd=9,79) anos.

Não houve diferenças significativas na idade da menopausa nos dois grupos. O grupo de controlo apresentava maior número de mulheres com mais de duas gestações de termo (p=0,076) mas menor número de mulheres que amamentaram (p=0,03). Não houve diferenças estatisticamente significativas na idade do primeiro parto ou história familiar de cancro da mama. O uso de hormonas exógenas (terapia hormonal) foi superior nas mulheres do grupo controlo (36,1% vs 24,6%; p=0,029). O IMC foi ligeiramente superior no grupo de controlo (29,1 vs 28,6Kg/m²; p=0,054) mas sem significado estatístico.

2. Caracterização dos tumores:

A grande maioria dos tumores foi diagnosticada em estádios iniciais (85% nos estádios 0, I e II). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal invasivo (76,5% dos casos). Em 38% dos casos os tumores eram bem diferenciados e a maioria tinha receptores hormonais positivos (RE - 78,3% e RP - 61,2%) e ausência de expressão de HER2 (74,3%). (tabela III).

Tabela III: Caracterização dos tumores

Cancro da mama					
n=187					
Tipo histológico	CDIS 8 (4,3%)	CDI 143 (76,5%)	CLI 19 (10,1%)	outros 19 (10,1%)	
Estádio	0 9 (4,8%)	I 59 (31,5%)	II 91 (48,7%)	III 22 (11,8%)	IV 6 (3,2%)
Grau de diferenciação	G1 69 (38,9%)	G2 87 (49,2%)	G3 21 (11,9%)	<i>na</i> 10	
RE	Positivos 126 (78,3%)	Negativos 35 (21,7%)	<i>na</i> 26		
RP	Positivos 90 (61,2%)	Negativos 57 (38,8%)	<i>na</i> 40		
HER2	Positivo 37 (25,7%)	Negativo 107 (74,3%)	<i>na</i> 44		

CDIS: carcinoma ductal *in situ*; CDI carcinoma ductal invasivo; CLI carcinoma lobular invasivo; *na*: não avaliados/indisponíveis

3. Comparação das frequências alélicas e genotípicas:

As frequências alélicas e genotípicas* encontradas para os polimorfismos *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e *CYP19 G>A* estão descritas nas tabelas IV e V.

Tabela IV: Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T*

<i>CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T</i>		Casos (187) <i>n</i> (freq.)	Controlos (133) <i>n</i> (freq.)	p	OR (IC 95%)
Genótipos	<i>TT</i>	73 (0,39)	40 (0,30)	0,09	1,49 (0,93-2,39)
	<i>CC</i>	42 (0,225)	30 (0,23)	<i>NS</i>	0,99 (0,58-1,69)
	<i>CT</i>	72 (0,385)	63 (0,47)	<i>NS</i>	0,70 (0,44-1,09)
Alelos	<i>T</i>	218 (0,58)	143 (0,54)	<i>NS</i>	1,20 (0,88-1,65)
	<i>C</i>	156 (0,42)	123 (0,46)	<i>NS</i>	0,83 (0,61-1,14)

n: número de indivíduos com o genótipo ou número de alelos; freq.: frequência do genótipo ou do alelo

Tabela V: Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo e *CYP 19 G>A*

<i>CYP 19 G>A</i>		Casos (187) <i>n</i> (freq.)	Controlos (133) <i>n</i> (freq.)	p	OR (IC 95%)
Genótipos	<i>AA</i>	44 (0,23)	35 (0,26)	<i>NS</i>	0,86 (0,52-1,44)
	<i>GG</i>	65 (0,35)	33 (0,25)	0,057	1,68 (0,98-2,65)
	<i>GA</i>	78 (0,42)	65 (0,49)	<i>NS</i>	0,75 (0,45-1,17)
Alelos	<i>A</i>	166 (0,44)	135 (0,51)	<i>NS</i>	0,77 (0,57-1,06)
	<i>G</i>	208 (0,56)	131 (0,49)	<i>NS</i>	1,29 (0,94-1,77)

n: número de indivíduos com o genótipo ou número de alelos; freq.: frequência do genótipo ou do alelo

Ambas as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para estes polimorfismos ($p > 0,05$).

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na avaliação das frequências alélicas e genotípicas entre as duas populações. No entanto, para o polimorfismo *CYP19 C¹⁵⁵⁸T*, verificou-se um aumento da frequência do genótipo *TT*, com OR=1,49 (IC95%=0,93-2,39; $p=0,09$) que, apesar de não ter significado estatístico, sugere uma tendência de aumento de risco de cancro da mama associado a esta variante. Da mesma forma, para o polimorfismo *CYP19 G>A*, o genótipo *GG* e o alelo *G*, apresentaram OR=1,68 (IC95%=0,98-2,65; $p=0,057$) e 1,29 (IC95%=0,94-1,77; $p=0,1$), próximos do significado estatístico.

* Para o cálculo das frequências alélicas o número de determinado alelo numa população é dividido pelo número total desse alelo na população. Para um alelo de *locus* autossómico o denominador corresponde a $2xn$.

O número de repetições detectadas para o polimorfismo STR *CYP19 (TTTA)_n* variou de sete a treze, correspondendo a sequências amplificadas com os comprimentos de 294, 298, 302, 306, 310, 314 e 318pb, conforme previamente descrito. Os alelos mais frequentes foram o *(TTTA)₇* e o *(TTTA)₁₁*, seguidos do *(TTTA)₈* (tabela VI).

O estudo das frequências alélicas do *CYP19 (TTTA)_n* revelou, para as mulheres com cancro da mama, um aumento de 2,33 da frequência do alelo *(TTTA)₁₀* (p=0,13) e um aumento muito ligeiro de 1,15 do alelo *(TTTA)₁₁* (p=0,4).

Tabela VI: Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo *(TTTA)_n*

<i>CYP 19 (TTTA)_n</i> <i>alelos</i>	<i>Casos (181)</i> <i>n (freq.)</i>	<i>Controlos (127)</i> <i>n (freq.)</i>	<i>p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>(TTTA)₇</i>	167 (0,46)	126 (0,496)	<i>NS</i>	0,87 (0,63-1,20)
<i>(TTTA)₈</i>	34 (0,09)	29 (0,114)	<i>NS</i>	0,80 (0,48-1,36)
<i>(TTTA)₉</i>	6 (0,02)	0	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)₁₀</i>	13 (0,04)	4 (0,016)	<i>NS</i>	2,33 (0,75-7,22)
<i>(TTTA)₁₁</i>	130 (0,36)	83 (0,327)	<i>NS</i>	1,15 (0,82-1,62)
<i>(TTTA)₁₂</i>	12 (0,03)	10 (0,039)	<i>NS</i>	0,84 (0,36-1,97)
<i>(TTTA)₁₃</i>	0	2 (0,008)	<i>NS</i>	-

n: número de alelos; freq.: frequência alélica

Na distribuição genotípica do *CYP19 (TTTA)_n* (tabela VII), os genótipos com dois alelos com ≥ 10 repetições [*(TTTA)_{10/11}*, *(TTTA)₁₁* e *(TTTA)_{11/12}*] associaram-se a um aumento significativo do risco para cancro da mama (OR=1,91, IC 95%=1,05-3,59, p=0,04).

Tabela VII: Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo *(TTTA)_n*

<i>CYP 19 (TTTA)_n</i> <i>genótipos</i>	<i>Casos (181)</i> <i>n (freq.)</i>	<i>Controlos (127)</i> <i>n (freq.)</i>	<i>p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>(TTTA)_{7/7}</i>	49 (0,27)	33 (0,26)	<i>NS</i>	1,06 (0,63-1,77)
<i>(TTTA)_{7/8}</i>	10 (0,055)	11 (0,087)	<i>NS</i>	0,62 (0,25-1,50)
<i>(TTTA)_{7/9}</i>	3 (0,02)	0	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)_{7/10}</i>	6 (0,03)	2 (0,016)	<i>NS</i>	2,14(0,43-10,79)
<i>(TTTA)_{7/11}</i>	47 (0,26)	38 (0,299)	<i>NS</i>	0,82 (0,50-1,36)
<i>(TTTA)_{7/12}</i>	3 (0,02)	7 (0,055)	<i>NS</i>	0,29 (0,07-1,14)
<i>(TTTA)_{7/13}</i>	0	2 (0,016)	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)_{8/8}</i>	2 (0,01)	0	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)_{8/9}</i>	1 (0,005)	0	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)_{8/10}</i>	1(0,005)	2 (0,016)	<i>NS</i>	0,35 (0,03-3,87)
<i>(TTTA)_{8/11}</i>	17 (0,09)	16 (0,126)	<i>NS</i>	0,72 (0,35-1,48)
<i>(TTTA)_{8/12}</i>	1(0,005)	0	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)_{9/11}</i>	2 (0,01)	0	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)_{10/11}</i>	6 (0,03)	0	<i>NS</i>	-
<i>(TTTA)_{11/11}</i>	25 (0,14)	13 (0,102)	<i>NS</i>	1,41 (0,69-2,87)
<i>(TTTA)_{11/12}</i>	8 (0,04)	3 (0,024)	<i>NS</i>	2,89 (0,60-13,84)
<i>2 alelos ≥ 10</i>	39 (0,21)	16 (0,125)	0,04	1,91 (1,05-3,59)

n: número de indivíduos com o genótipo; freq.: frequência do genótipo

4. Análise dos níveis séricos das hormonas sexuais:

O estudo hormonal foi efectuado num grupo de 32 mulheres com cancro da mama e 98 mulheres do grupo de controlo, cujas características demográficas não diferem da população total do estudo. Foi efectuada a determinação dos valores séricos hormonais do estradiol, estrona, testosterona, androstenediona e SHBG, conforme descrito no capítulo "Material e Métodos".

Os valores médios de estradiol foram significativamente mais elevados na população controlo (tabela VIII) ($p=0,002$) com valores inferiores a 20pg/ml em 52% da população controlo em comparação com 81,3% na população com cancro da mama. Os níveis séricos da testosterona total também apresentaram valores médios mais elevados na população controlo ($p=0,05$). A SHBG apresentou valores séricos médios mais elevados na população com cancro da mama ($p=0,015$). Os níveis médios séricos de estrona e androstenediona foram mais elevados na população com cancro da mama, embora a diferença não seja estatisticamente significativa.

Tabela VIII: Valores séricos hormonais de estradiol, estrona, testosterona total, androstenediona e SHBG

	Casos n=32 [\bar{X} (sd)]	Controlos n=98 [\bar{X} (sd)]	p
Estradiol, pg/ml	8,9 (12,2)	21,2 (22,6)	0,002
Estrona, pg/ml	37,5 (22,4)	30,7 (18,8)	NS
Testosterona total, ng/ml	0,40 (0,22)	0,47 (0,19)	0,05
Androstenediona, ng/ml	1,63 (2,52)	1,1 (0,61)	NS
SHBG, nmol/ml	47,6 (20,2)	37,5 (16,6)	0,01

\bar{X} : média; sd: desvio padrão

Foram analisadas as variações dos níveis séricos hormonais em função dos diferentes polimorfismos (tabelas IX-XI).

Nas mulheres com cancro da mama, o genótipo *TT* associou-se a níveis médios de estradiol e estrona superiores aos dos genótipos *CC* e *CT* sem significado estatístico (tabela IX).

Tabela IX: Variação dos valores médios das hormonas circulantes com o polimorfismo *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T*

<i>CYP19 C¹⁵⁵⁸-T</i>				
Casos=32				
Controlos=98				
	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>TC</i>	<i>P</i>
	n1=13 / n2=28	n1=7 / n2=22	n1=12 / n2=48	
	[\bar{X} (sd)]	[\bar{X} (sd)]	[\bar{X} (sd)]	
Estradiol, pg/ml				
• Casos	11,1 (13,6)	6,6 (13,2)	6,9 (9,8)	<i>NS</i>
• Controlos	21,9 (23,5)	23,1 (23,6)	20,1 (21,9)	<i>NS</i>
Estrona, pg/ml				
• Casos	43,7 (26,4)	35,4 (14,1)	31,9 (20,3)	<i>NS</i>
• Controlos	29,9 (18,7)	29,5 (14,3)	31,6 (20,6)	<i>NS</i>
Testosterona total, ng/ml				
• Casos	0,35 (0,16)	0,46 (0,3)	0,43 (0,16)	<i>NS</i>
• Controlos	0,41 (0,18)	0,50 (0,18)	0,48 (0,19)	<i>NS</i>
Androstenediona, ng/ml				
• Casos	1,1 (0,68)	1,4 (1,4)	2,5 (4,1)	<i>NS</i>
• Controlos	1,14 (1,1)	1,11 (0,6)	1,22 (1,2)	<i>NS</i>
SHBG, nmol/ml				
• Casos	57,9 (24,3)	35,9 (8,6)	51,6 (32,9)	<i>NS</i>
• controlos	33,8 (16,1)	39,8 (20,8)	38,8 (38,8)	<i>NS</i>

n1: casos; n2: controlos; \bar{X} : média; sd: desvio padrão; *NS*: p>0,05

Em relação ao polimorfismo *CYP19 G>A*, nas mulheres com cancro da mama, o genótipo *GG* associou-se a níveis séricos médios de estradiol e estrona superiores aos do genótipos *AA*, embora também sem significado estatístico (tabela X).

Tabela X: Variação dos valores médios das hormonas circulantes com o polimorfismo *CYP19 G>A*

<i>CYP19 G>A</i>				
Casos=32				
Controlos=98				
	<i>GG</i>	<i>AA</i>	<i>GA</i>	<i>P</i>
	n1=12 / n2=24	n1=8 / n2=25	n1=12 / n2=49	
	[\bar{X} (sd)]	[\bar{X} (sd)]	[\bar{X} (sd)]	
Estradiol, pg/ml				
• Casos	10,3 (13,9)	3,5 (6,7)	18,3 (12,8)	<i>NS</i>
• Controlos	20,5 (23,4)	22,4 (23,1)	21,4 (22,3)	<i>NS</i>
Estrona, pg/ml				
• Casos	44,5 (27,4)	36,9 (13,4)	36,8 (19,9)	<i>NS</i>
• Controlos	29,4 (15,8)	29,9 (13,7)	31,7 (22,1)	<i>NS</i>
Testosterona total, ng/ml				
• Casos	0,35 (0,17)	0,49 (0,30)	0,43 (0,17)	<i>NS</i>
• Controlos	0,41 (0,15)	0,47 (0,19)	0,49 (0,20)	<i>NS</i>
Androstenediona, ng/ml				
• Casos	1,1 (0,7)	1,4 (1,3)	2,3 (4,1)	<i>NS</i>
• Controlos	1,1 (0,58)	1,1 (0,56)	1,2 (0,65)	<i>NS</i>
SHBG, nmol/ml				
• Casos	56,7 (24,9)	47,6 (37,8)	45,1 (14,5)	<i>NS</i>
• controlos	32,5 (13,6)	37,2 (20,5)	40,1 (15,7)	<i>NS</i>

n1: casos; n2: controlos; \bar{X} : média; sd: desvio padrão; *NS*: p>0,05

Não se observam outras variações com significado estatístico ou clinicamente relevantes entre os níveis séricos hormonais e os polimorfismos *CYP19 C⁴⁵⁵⁸-T* e *CYP19 G>A*.

Na análise das variações hormonais em função do polimorfismo *(TTTA)_n* foram estudados os casos e controlos homocigóticos ou heterocigóticos para cada uma das diferentes repetições. Destaca-se a associação dos genótipos homocigóticos ou heterocigóticos para o *(TTTA)₁₁* com os níveis médios da estrona no grupo controlo significativamente inferiores aos observados para os restantes genótipos [27,6(sd=16,4) pg/ml, p=0,04], verificando-se também que os níveis séricos médios foram mais elevados nos casos do que nos controlos [43,9(sd=27,4) vs 27,6(sd=16,4) pg/ml], ao contrário do que se observou para as restantes repetições (tabela XI). Não se observaram outras variações com significado estatístico ou clinicamente relevantes entre os níveis séricos hormonais e este polimorfismo, mesmo quando se associaram os alelos com número de repetições >7 em comparação com ≤7. O mesmo se verificou em relação à avaliação dos genótipos com número de repetições ≥10 em comparação com <10.

Tabela XI: Variação dos valores médios das hormonas circulantes com o polimorfismo *(TTTA)_n*

<i>CYP19 (TTTA)_n</i>*							
Casos=30							
Controlos=96							
	<i>(TTTA)7</i> n1=18 /n2=71 [\bar{X} (sd)]	<i>(TTTA)8</i> n1=8 /n2=20 [\bar{X} (sd)]	<i>(TTTA)10</i> n1=3 /n2=3 [\bar{X} (sd)]	<i>(TTTA)11</i> n1=17 /n2=52 [\bar{X} (sd)]	<i>(TTTA)12</i> n1=2 /n2=8 [\bar{X} (sd)]	<i>(TTTA)13</i> n1=0/n2=2 [\bar{X} (sd)]	<i>P</i>
Estradiol, pg/ml							
• Casos	7,9 (11,8)	9,5 (10,30)	8,3 (14,4)	10,0 (13,4)	11,0 (15,6)	-	<i>NS</i>
• Controlos	21,5 (22,3)	21,9 (19,3)	49,7 (20,7)	21,8 (24,5)	9,9 (14,6)	7,5 (10,6)	
Estrona, pg/ml							
• Casos	34,2 (17,5)	29,8 (16,9)	23,3 (17,9)	43,9 (27,4)	52,0 (11,3)	-	<i>NS</i>
• Controlos	30,5 (18,4)	31,9 (15,7)	54,0 (28,8)	27,6 (16,4)	44,7 (36,5)	28,5 (2,1)	
Test.total,ng/ml							
• Casos	0,45 (0,27)	0,28 (0,09)	0,60 (0,17)	0,38 (0,16)	0,20 (-)	-	<i>NS</i>
• Controlos	0,48 (0,19)	0,47 (0,19)	0,57 (0,31)	0,43 (0,17)	0,51 (0,22)	0,65 (0,35)	
Androst., ng/ml							
• Casos	1,28 (1,1)	2,44 (4,7)	1,27 (0,49)	1,68 (2,7)	0,7 (-)	-	<i>NS</i>
• Controlos	1,18 (0,6)	1,12 (0,65)	1,40 (0,44)	1,17 (0,66)	1,31 (0,47)	1,1 (0)	
SHBG, nmol/ml							
• Casos	37,9 (10,2)	54,1 (25,1)	59,3 (6,7)	58,2 (30,9)	37,0 (-)	-	<i>NS</i>
• Controlos	38,8 (18,1)	34,8 (16,5)	34,7 (13,5)	35,7 (14,9)	41,6 (15,44)	49,5 (19,1)	

*Avaliados casos e controlos homocigóticos e heterocigóticos para cada uma das diferentes repetições

Test total: testosterona total; Androst.: androstenediona; n1: casos; n2: controlos; \bar{X} : média; sd: desvio padrão; *NS*: p>0,05

5. Associação entre os genótipos e factores de prognóstico:

Nas mulheres com cancro da mama avaliou-se a associação entre os diferentes polimorfismos e factores de prognóstico para cancro da mama.

5.1. Estádio da doença:

Foi efectuada a avaliação do risco para estádios mais avançados (III e IV) em relação aos diferentes genótipos dos três polimorfismos estudados. Verificou-se uma tendência na associação do genótipo *TT* do *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* com estádios mais avançados da doença mas sem significado estatístico (tabela XII).

Tabela XII: Correlação entre estágio da doença e frequências genotípicas do polimorfismo *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T*

		Estádio		<i>p</i>	OR (IC-95%)
		0/I/II n=159	III/IV n=28		
<i>CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T</i> (n=187)	<i>TT</i>	58 (0,37)	15 (0,54)	0,087	2,01 (0,89-4,52)
	<i>CC</i>	39 (0,24)	3 (0,10)	<i>NS</i>	0,37 (0,11-1,29)
	<i>CT</i>	62 (0,39)	10 (0,36)	<i>NS</i>	0,87 (0,38-2,01)

n: número de indivíduos; *NS*: $p > 0,05$

Da mesma forma, o genótipo *GG* revelou uma tendência para se associar a estádios mais avançados da doença (tabela XIII) mas sem significado estatístico.

Tabela XIII: Correlação entre estágio da doença e frequências genotípicas do polimorfismo *CYP 19 G>A*

		Estádio		<i>p</i>	OR (IC-95%)
		0/I/II n=159	III/IV n=28		
<i>CYP19 G>A</i> (n=187)	<i>GG</i>	52 (0,33)	13 (0,46)	<i>NS</i>	1,78 (0,79-4,02)
	<i>AA</i>	39 (0,24)	5 (0,18)	<i>NS</i>	0,67 (0,24-1,88)
	<i>GA</i>	68 (0,43)	10 (0,36)	<i>NS</i>	0,74 (0,32-1,71)

n: número de indivíduos; *NS*: $p > 0,05$

Estudou-se a distribuição das frequências genotípicas e alélicas do STR (*TTTA*)_n pelos diferentes estádios da doença. Os genótipos homocigóticos ou heterocigóticos para o (*TTTA*)₁₁ foram mais frequentes nos tumores em estádios mais avançados (tabela XIV), embora sem significado estatístico. A avaliação dos genótipos contendo dois alelos com número de

repetições >7 em comparação com ≤7 não revelou qualquer associação com o estágio da doença. O mesmo se verificou em relação à avaliação dos genótipos com número de repetições ≥10 em comparação com <10.

Tabela XIV: Correlação entre estágio da doença e frequências genóticas do polimorfismo *(TTTA)_n*

		Estádio		<i>p</i>	OR (IC-95%)
		0/I/II n=153	III/IV n=28		
<i>(TTTA)_n</i> n=181	<i>(TTTA)7</i>	102 (0,67)	16 (0,57)	<i>NS</i>	0,67 (0,29-1,51)
	<i>(TTTA)8</i>	28 (0,18)	4 (0,14)	<i>NS</i>	0,74 (0,24-2,32)
	<i>(TTTA)9</i>	6 (0,04)	-	<i>NS</i>	NS
	<i>(TTTA)10</i>	11 (0,07)	2 (0,07)	<i>NS</i>	0,99 (0,21-4,74)
	<i>(TTTA)11</i>	85 (0,56)	20 (0,71)	<i>NS</i>	2,00 (0,83-4,82)
	<i>(TTTA)12</i>	11 (0,07)	1 (0,04)	<i>NS</i>	0,46 (0,06-3,69)

* homozigóticos e heterozigóticos para cada uma das diferentes repetições; n: número de indivíduos; *NS*: *p*>0,05

Já a avaliação das frequências alélicas (tabela XV), demonstrou que o alelo *(TTTA)11* estava significativamente associado a tumores em estádios mais avançados (OR=1,83, IC95%=1,03-3,26; *p*=0,036).

Tabela XV: Correlação entre estágio da doença e frequências alélicas do polimorfismo *(TTTA)_n*

		Estádio		<i>p</i>	OR (IC-95%)
		0/I/II n=153	III/IV n=28		
		n*(freq.)	n*(freq.)		
<i>(TTTA)_n</i> n=181	<i>(TTTA)7</i>	146 (0,48)	21 (0,37)	-	0,66 (0,37-1,18)
	<i>(TTTA)8</i>	29 (0,09)	5 (0,09)	-	0,89 (0,33-2,42)
	<i>(TTTA)9</i>	6 (0,02)	-	-	-
	<i>(TTTA)10</i>	11 (0,04)	2 (0,04)	-	0,95 (0,21-4,41)
	<i>(TTTA)11</i>	103 (0,33)	27 (0,48)	0,036	1,83 (1,03-3,26)
	<i>(TTTA)12</i>	11 (0,04)	1 (0,02)	-	0,47 (0,06-3,69)

n: número de indivíduos; n* número de alelos; freq.: frequências; *NS*: *p*>0,05

5.2. Grau de diferenciação tumoral:

Efectuou-se a avaliação do risco para tumores moderadamente diferenciados/pouco diferenciados (G2/G3) em relação aos diferentes genótipos.

Observou-se uma associação entre o genótipo *CC* do *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* (tabela XVI) e o genótipo *AA* do *CYP19 G>A* (tabela XVII) com tumores de graus mais elevados (OR=1,74, IC95%=0,82-3,71; $p=0,14$ e OR=2,93, IC95%=1,3-6,60; $p=0,007$, respectivamente), este último com significado estatístico.

Tabela XVI: Correlação entre os genótipos *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e o grau de diferenciação tumoral

		Grau de diferenciação			
		G1 n=69	G2/G3 n=108	p	OR (IC-95%)
<i>CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T</i> (n=177)	<i>TT</i>	29 (0,42)	41 (0,58)	<i>NS</i>	0,84 (0,46-1,56)
	<i>CC</i>	12 (0,30)	29 (0,70)	<i>NS</i>	1,74 (0,82-3,71)
	<i>CT</i>	28 (0,43)	38 (0,57)	<i>NS</i>	0,79 (0,43-1,48)

n: número de indivíduos; *NS*: $p>0,05$

Tabela XVII: Correlação entre os genótipos *CYP19 G>A* e o grau de diferenciação tumoral

		Grau de diferenciação			
		G1 n=69	G2/G3 n=108	p	OR (IC-95%)
<i>CYP19 G>A</i> (n=177)	<i>GG</i>	25 (0,40)	37 (0,60)	<i>NS</i>	0,92 (0,49-1,72)
	<i>AA</i>	9 (0,21)	33 (0,79)	0,007	2,93 (1,3-6,60)
	<i>GA</i>	35 (0,48)	38 (0,42)	<i>NS</i>	0,53 (0,28-0,98)

n: número de indivíduos; *NS*: $p>0,05$

Para o polimorfismo (*TTTA*)_{*n*} (tabela XVIII), verificou-se que os genótipos homozigóticos ou heterozigóticos para o (*TTTA*)₁₁ se associaram, de forma estatisticamente significativa, a tumores bem diferenciados (G1) ($p=0,009$). Os genótipos com dois alelos com número de repetições <10 associaram-se significativamente a tumores com graus mais elevados de diferenciação (OR=2,12, IC95%=1,09-4,12; $p=0,025$) assim como os genótipos com 2 alelos (*TTTA*)₇ (OR=2,15; IC95% 1,04-4,45; $p=0,037$).

Tabela XVIII: Correlação entre os genótipos *CYP19* (*TTTA*)*n* e o grau de diferenciação tumoral

		Grau de diferenciação			
<i>(TTTA)n*</i>		G1 n=68	G2/G3 n=104	<i>p</i>	OR (IC-95%)
<i>(TTTA)n</i> n=172	<i>(TTTA)7</i>	42 (0,62)	70 (0,67)	<i>NS</i>	1,27 (0,67-2,41)
	<i>(TTTA)8</i>	10 (0,15)	22 (0,21)	<i>NS</i>	1,56 (0,69-3,53)
	<i>(TTTA)9</i>	3 (0,04)	2 (0,02)	<i>NS</i>	0,42 (0,07-2,61)
	<i>(TTTA)10</i>	6 (0,09)	7 (0,07)	<i>NS</i>	0,75 (0,24-2,32)
	<i>(TTTA)11</i>	47 (0,69)	51 (0,49)	0,009	0,43 (0,23-0,82)
	<i>(TTTA)12</i>	4 (0,06)	6 (0,06)	<i>NS</i>	0,98 (0,27-3,54)
<i>2 alelos <10</i>		18 (0,26)	45 (0,43)	0,025	2,12 (1,09-4,12)
<i>2 alelos (TTTA)7</i>		13 (0,19)	35 (0,34)	0,037	2,15 (1,04-4,45)

* homozigóticos e heterozigóticos para cada uma das diferentes repetições; n: número de indivíduos; *NS*: $p > 0,05$

Quanto ao estudo das frequências alélicas, verificou-se que os alelos *(TTTA)7* e *(TTTA)8* se associaram a graus mais elevados de diferenciação mas sem significado estatístico (tabela XIX). O alelo *(TTTA)11* associou-se, de forma estatisticamente significativa, a tumores bem diferenciados (G1) ($p=0,02$).

Tabela XIX: Correlação entre os alelos *CYP19* (*TTTA*)*n* e o grau de diferenciação tumoral

		Grau de diferenciação			
<i>(TTTA)n</i>		G1 n=68	G2/G3 n=104	<i>p</i>	OR (IC-95%)
		n*(freq.)	n*(freq.)		
<i>(TTTA)n</i> n=172	<i>(TTTA)7</i>	55(0,40)	105(0,50)	0,07	1,50 (0,97-2,32)
	<i>(TTTA)8</i>	10(0,07)	24(0,12)	<i>NS</i>	1,64 (0,76-3,56)
	<i>(TTTA)9</i>	3(0,03)	2(0,01)	<i>NS</i>	0,43 (0,07-2,64)
	<i>(TTTA)10</i>	6(0,04)	7(0,03)	<i>NS</i>	0,75 (0,25-2,30)
	<i>(TTTA)11</i>	58(0,43)	64(0,31)	0,02	0,60 (0,38-0,94)
	<i>(TTTA)12</i>	4(0,03)	6(0,03)	<i>NS</i>	0,98 (0,27-3,54)

n: número de indivíduos; n* número de alelos; freq.: frequências; *NS*: $p > 0,05$

5.3. Receptores hormonais a nível do tumor:

Avaliou-se o risco de ocorrência de tumores com receptores hormonais negativos para os diferentes genótipos. Estudaram-se os receptores de estrogénios em 161 casos (86,1%) e os receptores de progesterona em 147 casos (78,6%).

Quanto aos genótipos do polimorfismo *CYP19* C¹⁵⁵⁸T, não se verificou nenhuma associação com significado estatístico, embora as mulheres homozigóticas ou heterozigóticas para o alelo C (CC e CT) do *CYP19* C¹⁵⁵⁸T, tivessem mais frequentemente tumores com RE negativos (tabela XX).

Tabela XX: Correlação entre os genótipos *CYP19* C¹⁵⁵⁸-T e os receptores de estrogénios nos tumores

		Receptores de estrogénios			
		Positivos n=126	Negativos n=35	<i>p</i>	OR (IC-95%)
<i>CYP 19</i> C¹⁵⁵⁸-T n=161	TT	51 (0,40)	11 (0,31)	NS	0,67 (0,30-1,50)
	CC	29 (0,23)	10 (0,29)	NS	1,34 (0,58-3,11)
	CT	46 (0,37)	14 (0,40)	NS	1,16 (0,54-2,50)

n: número de indivíduos; NS: $p > 0,05$

No respeitante ao polimorfismo *CYP19* G>A, o genótipo AA parece estar associado a maior risco de ocorrência de tumores com RE negativos (OR=1,68, IC95%=0,73-3,86; $p=0,22$) mas também sem atingir significado estatístico (tabela XXI).

Tabela XXI: Correlação entre os genótipos *CYP19* G>A e os receptores de estrogénios nos tumores

		Receptores de estrogénios			
		Positivos n=126	Negativos n=35	<i>p</i>	OR (IC-95%)
<i>CYP 19</i> G>A n=161	GG	45 (0,36)	10 (0,29)	NS	0,72 (0,32-1,63)
	AA	27 (0,21)	11 (0,31)	NS	1,68 (0,73-3,86)
	GA	54 (0,43)	14 (0,40)	NS	0,89 (0,41-1,91)

n: número de indivíduos; NS: $p > 0,05$

Verificou-se que a homozigotia ou heterozigotia para o alelo (*TTTA*)₁₁ era protectora, diminuindo a probabilidade de tumores com RE negativos ($p=0,006$) (tabela XXII). A homozigotia para o alelo (*TTTA*)₇ associou-se, de forma estatisticamente significativa, a tumores com RE negativos ($p=0,04$).

Tabela XXII: Correlação entre os genótipos *CYP19* (*TTTA*)*n* e os receptores de estrogénios nos tumores

		Receptores de estrogénios			
	(<i>TTTA</i>) <i>n</i> *	Positivos n=123	Negativos n=33	<i>p</i>	OR (IC-95%)
(<i>TTTA</i>)<i>n</i> n=156	(<i>TTTA</i>)7	78 (0,63)	24 (0,73)	<i>NS</i>	1,54 (0,66-3,60)
	(<i>TTTA</i>)8	22 (0,18)	6 (0,18)	<i>NS</i>	1,02(0,38-2,77)
	(<i>TTTA</i>)9	3 (0,02)	2 (0,06)	<i>NS</i>	2,58 (0,41-16,1)
	(<i>TTTA</i>)10	8 (0,07)	4 (0,12)	<i>NS</i>	1,98 (0,56-7,04)
	(<i>TTTA</i>)11	77 (0,63)	12 (0,36)	0,006	0,34 (0,15-0,76)
	(<i>TTTA</i>)12	9 (0,07)	0 (0)	<i>NS</i>	-
	<i>2 alelos</i> ≤7		30 (0,24)	14 (0,42)	0,04

* homozigóticos e heterozigóticos para cada uma das diferentes repetições; n: número de indivíduos; *NS*: *p*>0,05

No estudo das frequências alélicas (tabela XXIII) verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre o alelo (*TTTA*)7 e a ocorrência de tumores com RE negativos (*p*=0,04), enquanto que o alelo (*TTTA*)11 se mostrou protector (*p*=0,009).

Tabela XXIII: Correlação entre os alelos *CYP19* (*TTTA*)*n* e os receptores de estrogénios nos tumores

		Receptores de estrogénios			
		Positivos n=123	Negativos n=33	<i>p</i>	OR (IC-95%)
		n*(freq.)	n*(freq.)		
(<i>TTTA</i>)<i>n</i> n=156	(<i>TTTA</i>)7	108 (0,44)	38 (0,58)	0,04	1,73 (1,00-3,00)
	(<i>TTTA</i>)8	23 (0,09)	7 (0,10)	<i>NS</i>	1,15(0,47-2,81)
	(<i>TTTA</i>)9	3 (0,01)	2 (0,03)	<i>NS</i>	2,53 (0,41-15,5)
	(<i>TTTA</i>)10	8 (0,03)	4 (0,06)	<i>NS</i>	1,92 (0,56-6,58)
	(<i>TTTA</i>)11	95 (0,39)	15 (0,23)	0,009	0,47 (0,25-0,88)
	(<i>TTTA</i>)12	9 (0,04)	0 (0)	-	-

n: número de indivíduos; n* número de alelos; freq.: frequências; *NS*: *p*>0,05

Da mesma forma que para os RE, parece haver uma associação do alelo *C* do *CYP 19* *C*¹⁵⁵⁸-*T* com tumores com RP negativos (tabela XXIV), estando os genótipos *CC* e *CT* associados a um aumento, embora não significativo, da ausência deste receptores nos tumores (OR=1,56, IC95%=0,72-3,39; *p*=0,56 e OR=1,14, IC95%=0,58-2,25; *p*=0,7, respectivamente).

Tabela XXIV: Correlação entre os genótipos *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e os receptores de progesterona nos tumores

		Receptores de progesterona			
		Positivos n=90	Negativos n=57	<i>p</i>	OR (IC-95%)
<i>CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T</i> n=147	<i>TT</i>	37 (0,41)	17 (0,30)	<i>NS</i>	0,51 (0,30-1,23)
	<i>CC</i>	18 (0,20)	16 (0,28)	<i>NS</i>	1,56 (0,72-3,39)
	<i>CT</i>	35 (0,39)	24 (0,42)	<i>NS</i>	1,14 (0,58-2,25)

n: número de indivíduos; *NS*: *p*>0,05

Para o polimorfismo *CYP19 G>A* (tabela XXV), o genótipo *AA* também parece estar associado a maior risco de tumores com RP negativos (OR=1,83, IC95%=0,84-3,96; *p*=0,12).

Tabela XXV: Correlação entre os genótipos *CYP19 G>A* e os receptores de progesterona nos tumores

		Receptores de progesterona			
		Positivos n=90	Negativos n=57	<i>p</i>	OR (IC-95%)
<i>CYP 19 G>A</i> n=147	<i>GG</i>	33 (0,37)	15 (0,26)	<i>NS</i>	0,62 (0,30-1,28)
	<i>AA</i>	17 (0,19)	17 (0,30)	<i>NS</i>	1,83 (0,84-3,96)
	<i>GA</i>	40 (0,44)	25 (0,44)	<i>NS</i>	0,98 (0,50-1,91)

n: número de indivíduos; *NS*: *p*>0,05

Para o polimorfismo $(TTTA)_n$ (tabela XXVI), a presença de pelo menos um alelo $(TTTA)_7$ (homozigóticos e heterozigóticos) associou-se aos tumores com RP negativos, embora sem significado estatístico (OR=2,07, IC95%=0,97-4,42; *p*=0,06).

Tabela XXVI: Correlação entre os genótipos $(TTTA)_n$ e os receptores de progesterona nos tumores

		Receptores de progesterona			
$(TTTA)_n^*$		Positivos n=87	Negativos n=55	<i>p</i>	OR (IC-95%)
$(TTTA)_n$ n=142	$(TTTA)_7$	53 (0,61)	42 (0,76)	0,06	2,07 (0,97-4,42)
	$(TTTA)_8$	16 (0,18)	8 (0,15)	<i>NS</i>	0,76 (0,30-1,91)
	$(TTTA)_9$	5 (1)	0 (0)	<i>NS</i>	NS
	$(TTTA)_{10}$	5 (0,45)	6 (0,55)	<i>NS</i>	2,01 (0,58-6,93)
	$(TTTA)_{11}$	55 (0,66)	28 (0,34)	<i>NS</i>	0,60 (0,30-1,20)
	$(TTTA)_{12}$	5 (0,63)	3 (0,38)	<i>NS</i>	0,95 (0,22-4,13)

* homozigóticos e heterozigóticos para cada uma das diferentes repetições; n: número de indivíduos; *NS*: *p*>0,05

O alelo (*TTTA*)₇ associou-se, de forma estatisticamente significativa, aos tumores com RP negativos (OR=1,66, IC95%=1,03-2,69; p=0,04) e o alelo (*TTTA*)₁₁ associou-se a tumores com RP positivos, embora sem significado estatístico (tabela XXVII).

Tabela XXVII: Correlação entre os alelos (*TTTA*)_n e os receptores de progesterona nos tumores

		Receptores de progesterona			p	OR (IC-95%)
		Positivos n=87 n*(freq.)	Negativos n=55 n*(freq.)			
(TTTA)_n n=142	(TTTA) ₇	73 (0,42)	60 (0,55)	0,04	1,66 (1,03 -2,69)	
	(TTTA) ₈	17 (0,10)	9 (0,08)	NS	0,82 (0,35-1,92)	
	(TTTA) ₉	5 (0,03)	0 (0)	-	-	
	(TTTA) ₁₀	5 (0,03)	6 (0,05)	NS	1,95 (0,58-6,55)	
	(TTTA) ₁₁	69 (0,39)	32 (0,29)	0,07	0,62 (0,37-1,04)	
	(TTTA) ₁₂	5 (0,03)	3 (0,03)	NS	0,95 (0,22-4,05)	

n: número de indivíduos; n* número de alelos; freq.: frequências; NS: p>0,05

5.4. Marcação tumoral de HER2:

Foi avaliado o risco para tumores com aumento da expressão de HER2 em relação aos diferentes genótipos em 144 casos (43 casos não avaliados ou indisponíveis).

Verificou-se a existência de uma associação estatisticamente significativa entre o genótipo *CC* do *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e o risco de ocorrência de tumores com sobre-expressão de HER2 (OR=2,49, IC95%=1,10-5,65; p=0,03) (tabela XXVIII).

Tabela XXVIII: Correlação entre os genótipos *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e a expressão tumoral de HER2

		HER2			p	OR (IC-95%)
		Positivo n=37	Negativo n=107			
<i>CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T</i> n=144	<i>TT</i>	14 (0,38)	42 (0,39)	NS	0,94 (0,44-2,03)	
	<i>CC</i>	14 (0,38)	21 (0,20)	0,03	2,49 (1,10-5,65)	
	<i>CT</i>	9 (0,24)	44 (0,41)	NS	0,46 (0,20-1,07)	

n: número de indivíduos; NS: p>0,05

Também se observou uma associação fortemente significativa entre o risco de tumores com sobre-expressão de HER2 e o genótipo *AA* do *CYP19 G>A* (OR=3,53, IC95%=1,56-7,99; p=0,001) (tabela XXIX).

Tabela XXIX: Correlação entre os genótipos *CYP19 G>A* e a expressão tumoral de HER2

		HER2			
		Positivo n=37	Negativo n=107	<i>p</i>	OR (IC-95%)
<i>CYP 19 G>A</i> n=144	<i>GG</i>	12 (0,33)	38 (0,35)	<i>NS</i>	0,87 (0,39-1,93)
	<i>AA</i>	16 (0,43)	19 (0,18)	0,001	3,53 (1,56-7,99)
	<i>GA</i>	9 (0,24)	50 (0,47)	<i>NS</i>	0,37 (0,16-0,85)

n: número de indivíduos; *NS*: $p > 0,05$

Os genótipos homozigóticos ou heterozigóticos para o *(TTTA)8* e *(TTTA)11* associaram-se a um risco reduzido para a ocorrência de tumores com sobre-expressão de HER2 ($p=0,02$ e $p=0,04$, respectivamente) (tabela XXX). Pelo contrário, a homozigotia para o alelo *(TTTA)7* revelou ser um factor de risco para a sobre-expressão de HER2 (OR=3,52, IC95%=1,56-7,94; $p=0,002$).

Tabela XXX: Correlação entre os genótipos *(TTTA)n* e a expressão tumoral de HER2

		HER2			
<i>(TTTA)n*</i>		Positivos n=35	Negativos n=104	<i>p</i>	OR (IC-95%)
<i>(TTTA)n</i> n=139	<i>(TTTA)7</i>	25 (0,71)	63 (0,61)	<i>NS</i>	1,67 (0,73-3,83)
	<i>(TTTA)8</i>	2 (0,06)	24 (0,23)	0,02	0,20 (0,05-0,92)
	<i>(TTTA)9</i>	2 (0,06)	3 (0,03)	<i>NS</i>	2,06 (0,33-12,87)
	<i>(TTTA)10</i>	2 (0,06)	7 (0,07)	<i>NS</i>	0,85 (0,17-4,29)
	<i>(TTTA)11</i>	15 (0,43)	66 (0,63)	0,04	0,44 (0,20-0,96)
	<i>(TTTA)12</i>	2 (0,06)	7 (0,07)	<i>NS</i>	0,79 (0,16-3,99)
<i>2 alelos ≤7</i>		17 (0,49)	22 (0,21)	0,002	3,52 (1,56-7,94)

* homozigóticos e heterozigóticos para cada uma das diferentes repetições; n: número de indivíduos; *NS*: $p > 0,05$

Em concordância com os dados anteriores, também se observou uma associação estatisticamente significativa entre o alelo *(TTTA)7* e os tumores com sobre-expressão de HER2 ($p=0,005$). Os alelos *(TTTA)8* e *(TTTA)11* revelaram-se protectores para estes tumores (tabela XXXI).

Tabela XXXI: Correlação entre os alelos (*TTTA*)*n* e a expressão tumoral de HER2

		HER2			
		Positivos n=35	Negativos n=104	<i>p</i>	OR (IC-95%)
		n*(freq.)	n*(freq.)		
(TTTA)<i>n</i> n=139	(TTTA)7	42 (0,60)	85 (0,41)	0,005	2,17 (1,25-3,77)
	(TTTA)8	2 (0,03)	25 (0,12)	0,02	0,22 (0,05-0,93)
	(TTTA)9	2 (0,03)	3 (0,02)	<i>NS</i>	2,01 (0,33-12,28)
	(TTTA)10	2 (0,03)	7 (0,03)	<i>NS</i>	0,84 (0,17-4,16)
	(TTTA)11	20 (0,28)	81 (0,39)	<i>NS</i>	0,63 (0,35-1,13)
	(TTTA)12	2 (0,03)	7 (0,03)	<i>NS</i>	0,84 (0,17-4,16)

n: número de indivíduos; n* número de alelos; freq.: frequências; *NS*: $p > 0,05$

6. Estudo do desequilíbrio de ligação entre os diferentes polimorfismos:

Na população controlo foi calculado o desequilíbrio de ligação alélica pelo método de Hill para os três polimorfismos estudados.

Na tabela XXXII pode verificar-se a existência de desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo *CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T* e o polimorfismo *CYP19 G>A* (alelos *T* e *G*; $p < 0,000008$ e alelos *C* e *A*; $p < 0,000007$).

Tabela XXXII: Estudo do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *CYP 19 C¹⁵⁵⁸T* e *CYP19 G>A*

		<i>CYP 19 G>A</i>			
n=133		GG	GA	AA	Total
<i>CYP19 C¹⁵⁵⁸T</i>	TT	31 (9,32)	8 (19,21)	1 (9,90)	40 (38,44)
	CT	1 (16,04)	56 (33,05)	6 (17,03)	63 (66,12)
	CC	1 (6,9)	1 (14,22)	28 (7,32)	30 (28,44)
	Total	33 (32,26)	65 (66,48)	35 (34,26)	133

valores observados e (esperados) para a população estudada

Para os polimorfismos *CYP 19 C¹⁵⁵⁸-T* e (*TTTA*)*n* confirmou-se a existência de desequilíbrio de ligação, já descrita, entre os polimorfismos *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e (*TTTA*)*n* [alelo *T* com alelos (*TTTA*)>7; $p < 0,00000005$; alelo *C* com o alelo (*TTTA*)>7; $p < 0,000006$] (tabela XXXIII).

Tabela XXXIII: Estudo do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *CYP19* C¹⁵⁵⁸-T e (TTTA)*n*

		<i>CYP19</i> C¹⁵⁵⁸T			
n=127		TT	CT	CC	Total
	(TTTA)7	0 (6,68)	4 (15,54)	29 (9,03)	33 (31,25)
<i>CYP19</i> (TTTA)<i>n</i>	(TTTA)7/>7	5 (13,58)	54 (31,57)	1 (18,35)	60 (63,5)
	(TTTA)>7	31 (6,90)	3 (16,03)	0 (9,32)	34 (32,25)
	Total	36 (27,16)	61 (63,14)	30 (36,70)	127

valores observados e (esperados) para a população estudada

Observou-se, igualmente a existência de desequilíbrio de ligação, entre os polimorfismos *CYP19* G>A e (TTTA)*n* [alelo G com alelos (TTTA)>7, p<0,000002; alelo A com alelos (TTTA)7; p<0,000001] (tabela XXXIV).

Tabela XXXIV: Estudo do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *CYP19* G>A e (TTTA)*n*

		<i>CYP19</i> G>A			
n=127		GG	GA	AA	Total
	(TTTA)7/7	1 (7,58)	1 (15,62)	31 (8,05)	33 (31,25)
<i>CYP19</i> (TTTA)<i>n</i>	(TTTA)7/>7	0 (15,40)	57 (31,74)	3 (16,36)	60 (63,5)
	(TTTA)>7	29 (7,82)	5 (16,12)	0 (8,31)	34 (32,25)
	Total	30 (30,80)	63 (63,49)	34 (32,71)	127

valores observados e (esperados) para a população estudada

V. Discussão

O conhecimento da susceptibilidade genética para o cancro da mama envolve o estudo de genes de baixa penetrância e tem como objectivo a identificação de perfis genéticos de risco que possibilitem a personalização de medidas preventivas, a avaliação do prognóstico e a selecção terapêutica.

Os estrogénios têm um papel bem definido na carcinogénese mamária e a exposição cumulativa a níveis séricos elevados está relacionada com a incidência desta doença^(26,27,43). A enzima aromatase catalisa o último passo da síntese dos estrogénios (por aromatização dos androgénios) e está descrito um aumento da sua actividade associado ao cancro da mama, com um papel determinante na biossíntese intra-tumoral de estrogénios^(24,38,39). O gene *CYP19* (15q21.1) codifica a enzima aromatase e é um gene candidato no estudo da susceptibilidade para o cancro da mama. Alguns estudos sugerem que os polimorfismos do gene *CYP19* têm o potencial de alterar a expressão deste gene, modificando a actividade da aromatase ou alterando os promotores tissulares activos, justificando, assim, a sua associação com o aumento do risco de cancro da mama^(24,39,49).

Efectuámos um estudo de associação de três polimorfismos do gene *CYP19*: os SNPs *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e *CYP19 G>A* e o STR (*TTTA*)_n, numa população de 187 mulheres com cancro da mama e 133 controlos.

Para o polimorfismo *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T*, nas mulheres caucasianas estão descritas as seguintes frequências alélicas e genótípicas: alelo *T* - 0,52 a 0,56; alelo *C* - 0,47 a 0,49; genótipo *TT* - 0,27 a 0,30; genótipo *CC* - 0,22 a 0,24 e genótipo *CT* - 0,45 a 0,52^(31,42,49). Zang *et al.*⁽⁵³⁾, também observaram frequências alélicas e genótípicas semelhantes numa população de mulheres chinesas. Na nossa população, as frequências alélicas e genótípicas foram sobreponíveis às descritas nas populações caucasianas: alelo *C* - 0,46; alelo *T* - 0,54; genótipo *TT* - 0,30; *CC* - 0,23; *CT* - 0,47.

O polimorfismo *CYP19 G>A* tem sido pouco estudado. Para este polimorfismo, a distribuição das frequências alélicas e genótípicas que encontramos (alelo *G* - 0,49; alelo *A* - 0,51; genótipos *GG* - 0,25; *AA* - 0,26 e *GA* - 0,49) são idênticas às descritas por Somner *et al.*⁽³⁵⁾ em populações caucasianas.

O número de repetições observadas para o STR (*TTTA*)_n varia de 7 a treze, sendo os alelos mais frequentes na população caucasiana o (*TTTA*)₇ (0,49-0,76) e o (*TTTA*)₁₁ (0,10-0,42), seguido do (*TTTA*)₈ (0,10)⁽⁵⁷⁾. As frequências alélicas encontradas na nossa população

estão de acordo com estas observações: 0,50 para o $(TTTA)_7$, 0,33 para o $(TTTA)_{11}$ e 0,11 para o $(TTTA)_8$. Miyoshi *et al.*⁽⁵⁷⁾, estudaram a distribuição das frequências alélicas na população japonesa, tendo verificado que o alelo $(TTTA)_8$ é muito raro (<0,03) e o alelo $(TTTA)_{12}$ tem frequências mais elevadas (0,101). Estudaram ainda uma variante, o $\Delta 3(TTTA)_7$, em que há deleção de três pares de bases, pelo que não é considerada repetição de tetranucleótido pela maioria dos autores. Okobia *et al.*⁽⁵⁴⁾ encontraram diferenças significativas na distribuição alélica numa população nigeriana, sendo os alelos mais frequentes o $(TTTA)_7$ (0,34) e o $(TTTA)_8$ (0,30). Estas frequências já tinham sido observadas por Probst-Hensch *et al.*⁽⁵⁸⁾, num estudo multiétnico que incluiu mulheres afro-americanas, japonesas, latinas e caucasianas não latinas.

Vários autores descreveram a existência de forte desequilíbrio de ligação alélico para os polimorfismos $(TTTA)_n$ e o $CYP19 C^{1558}-T$, havendo uma associação entre os alelos $(TTTA)_7$ e C e entre os alelos $(TTTA)_{>7}$ e T ^(40,45,49). Na nossa população, confirmou-se este desequilíbrio de ligação alélico: alelos $(TTTA)_7$ e C ($p < 0,000006$) e alelos $(TTTA)_{>7}$ e T ($p < 0,00000005$). Verificámos ainda a existência de desequilíbrio de ligação, não previamente descrito, para os polimorfismos $CYP19 C^{1558}-T$ e $CYP19 G>A$ com a associação dos alelos T e G ($p < 0,000008$) e dos alelos C e A ($p < 0,000007$) e entre os polimorfismos $CYP19 G>A$ e o $(TTTA)_n$ com associação entre os alelos $(TTTA)_7$ e A ($p < 0,000001$) e os alelos $(TTTA)_{>7}$ e G ($p < 0,000002$).

A existência de desequilíbrio de ligação facilita os estudos de associação ao identificar de haplótipos relacionados com a doença em estudo⁽⁵⁹⁾. Considerando os três polimorfismos, $CYP19 G>A$ (exão 3), $(TTTA)_n$ (intraão 4), e $CYP19 C^{1558}-T$ (exão 10) teríamos 2 haplótipos: $A-(TTTA)_7-C$ (A1) e $G-(TTTA)_{>7}-T$ (A2). Comparando com os haplótipos descritos por Paynter⁽⁶⁰⁾ e Haiman⁽³⁶⁾, a combinação A1 pode ocorrer nos haplótipos A, B, D e E e a combinação A2 pode ocorrer nos haplótipos C e F⁽⁶⁰⁾. A confirmação de desequilíbrio de ligação alélica entre estes polimorfismos é importante para estudos de associação futuros, tornando apenas necessário o estudo de um dos polimorfismos. As regiões genómicas com desequilíbrio de ligação alélica correspondem, habitualmente, a sequências conservadas ao longo da evolução e por isso mesmo se pensa que terão significado funcional⁽⁵⁹⁾.

O estudos de associação deste polimorfismos com aumento de susceptibilidade para o cancro da mama apresentaram resultados contraditórios. Para o polimorfismo $CYP 19 C^{1558}-T$ está descrita a associação, do genótipo TT (e alelo T) com cancro da mama. Kristensen *et al.*⁽⁴⁰⁾, encontraram uma associação estatisticamente significativa para o genótipo TT ($p=0,007$) com um OR de 1,51 (IC95%=1,04-2,16). Por outro lado, Zhang *et al.*⁽⁵³⁾, observaram um aumento de risco para homocigóticos ou heterocigóticos para o alelo T (OR=1,67; IC95%=

1,03-2,69), em especial nas mulheres pré-menopáusicas, tendo este risco um efeito aditivo com outros polimorfismos do gene *CYP17* e do gene *ER-α*. No entanto, Dunning *et al.*⁽³¹⁾ e Olson *et al.*⁽⁴²⁾, em estudos que incluíram vários SNPs, entre os quais este polimorfismo, não encontraram associação com significado estatístico com o aumento de risco de cancro da mama. No nosso estudo, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre casos e controlos, quer para as frequências alélicas, quer para as frequências genotípicas. Observa-se, no entanto, uma tendência para um aumento da frequência do genótipo *TT* e do alelo *T* na população com cancro da mama ($p=0,09$; $OR=1,49$ ($IC95\%=0,93-2,39$)).

O genótipo *AA* do polimorfismo *CYP19 G>A* foi associado a um aumento de risco para cancro da mama, a um perfil hiper-estrogénico e a um aumento da actividade da aromatase^(35,50,51). Contudo, na nossa população, o genótipo *GG* e o alelo *G* foram mais frequentes na população com cancro da mama ($OR=1,68$; $IC=95\%=0,98-2,65$; $p=0,057$, para o genótipo *GG*).

A associação do STR *CYP19 (TTTA)_n* com cancro da mama tem sido sugerida por vários autores. A maioria dos estudos revela um aumento do risco de cancro da mama associada à presença de alelos com maior número de repetições, nomeadamente os alelos *(TTTA)₁₀* e *(TTTA)₁₂*, embora frequentemente sem significado estatístico. Haiman *et al.*⁽⁴⁵⁾ e Kristensen *et al.*⁽⁴⁸⁾, descreveram a associação do alelo *(TTTA)₁₂* com cancro da mama com valores de OR de 1,63 ($IC95\%=0,91-2,93$), $p=0,11$ e de 2,42 ($IC95\%=1,03-5,80$), $p=0,046$, respectivamente. Esta associação não foi verificada por outros autores. Pelo contrário, Siegelmann-Danieli *et al.*⁽⁵¹⁾, observaram uma redução do risco de cancro da mama associado a este alelo e um aumento do risco associado ao alelo *(TTTA)₇* ($p=0,019$). No nosso estudo o alelo *(TTTA)₁₂* não revelou qualquer relação com cancro da mama. Quanto ao alelo *(TTTA)₁₀* há estudos que descrevem o aumento da sua frequência em mulheres com cancro da mama⁽⁴⁶⁾, embora nem sempre com significado estatístico⁽³⁴⁾. Relativamente aos genótipos, Haiman *et al.*⁽⁴⁵⁾, observaram uma associação entre heterozigóticos para o alelo *(TTTA)₁₀* e cancro da mama ($p=0,005$; $OR=2,87$, $IC 95\%$, 1,20-6,87). Na nossa população, o alelo *(TTTA)₁₀* foi mais frequente nas mulheres com cancro da mama ($OR=2,33$; $IC95\%=0,75-7,22$; $p=0,56$) assim como o genótipo com dois alelos com ≥ 10 repetições ($p=0,04$. $OR=1,91$; $IC95\%=1,01-3,59$). Dos genótipos correspondentes aos polimorfismos estudados, este foi o único que se revelou como marcador de susceptibilidade para o cancro da mama.

Vários autores estudaram a associação dos polimorfismos do *CYP19* com as concentrações séricas de hormonas sexuais. Haiman *et al.*⁽⁴⁵⁾ observaram uma redução dos níveis de sulfato de estrona ($p=0,02$), estrona ($p=0,11$), estradiol ($p=0,10$) e da relação

estrona /androstenediona ($p=0,08$) associada ao alelo (*TTTA*)⁷ e um aumento dos níveis de estradiol ($p=0,08$), estrona ($p=0,16$) e da relação estrona /androstenediona ($p=0,003$) associado ao alelo (*TTTA*)⁸. Nenhum destes alelos se associou a cancro da mama.

Num estudo da relação de diferentes SNPs (*CYP17*, *CYP19*, *EDH17B2*, *SHBG*, *COMT* e *CYP11B1*) com os níveis séricos de hormonas sexuais em mulheres pós-menopáusicas, Dunning *et al.*⁽³¹⁾ comprovaram a associação entre o alelo *T* do *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e aumento dos níveis séricos de estradiol e da relação estradiol/testosterona. O alelo *C* do *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* foi associado à diminuição dos níveis de estrona, da relação estrona/androstenediona e da relação estradiol/SHBG mas não com os valores absolutos de SHBG. Somner *et al.*⁽³⁵⁾, relacionaram a variação das hormonas sexuais com o polimorfismo *CYP19 G>A*, tendo verificado a associação do genótipo *AA* com concentrações séricas elevadas de estradiol ($p=0,03$) mas não com os níveis séricos das outras hormonas sexuais.

No nosso estudo não se verificaram as variações esperadas nos níveis séricos hormonais. Os níveis médios de estradiol foram significativamente mais elevados na população controlo ($p=0,002$). O inverso ocorreu para os níveis séricos de SHBG ($p=0,015$). Na população com cancro da mama, os níveis séricos de estrona e androstenediona foram mais elevados, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa.

A análise da variação dos níveis séricos hormonais com os diferentes genótipos dos polimorfismos estudados revelou um ligeiro aumento dos níveis de estradiol e estrona nas mulheres com cancro da mama associado aos genótipos *TT* do *CYP19 C¹⁵⁵⁸-T* e *GG* do *CYP19 G>A*, embora sem significado estatístico.

A diferença dos níveis de estradiol entre as duas populações não se correlacionou com a distribuição dos genótipos. Esta diferença inesperada dos valores hormonais entre as duas populações poderá ser justificada pela reduzida dimensão da amostra, pela diferença do IMC e dos níveis de SHBG entre os dois grupos. De facto, o IMC médio nas mulheres com cancro da mama foi ligeiramente inferior ao do grupo controlo ($p=0,054$). Embora a exposição prolongada a hormonas sexuais bem como a obesidade pós-menopausa sejam um factor de risco para cancro da mama, salienta-se o maior número de gestações nas mulheres do grupo controlo ($p=0,076$), o que constitui um factor de protecção. Nas obesas, o mecanismo de regulação da aromatase pode estar dependente de outros factores como o aporte aumentado de colesterol e não da actividade constitucional da enzima associada a variantes polimórficas. É possível que para a carcinogénese mamária seja mais importante a actividade local da enzima.

Muitos estudos têm avaliado os diferentes polimorfismos do gene *CYP19* como factor de risco de cancro da mama. No entanto, poucos autores se debruçaram sobre a relação destes polimorfismos com factores de prognóstico e características dos tumores.

Demonstrou-se existir um aumento da actividade da aromatase no tecido tumoral mamário, com aumento da síntese local de estrogénios. Os mecanismos incluem a utilização do promotor tissular específico de ovário (II) em detrimento do promotor do tecido mamário (I.4) e um aumento do mRNA implicando a regulação transcripcional do *CYP19* no desenvolvimento e progressão do cancro da mama⁽³⁸⁻⁴¹⁾.

Haiman *et al.*⁽⁴⁵⁾ descreveram a associação do alelo (*TTTA*)₁₀ com tumores em estádios mais avançados, com envolvimento ganglionar ($p=0,02$) e com RE e RP negativos; não houve diferenças relativas ao tipo histológico nem ao grau de diferenciação. Estes resultados foram confirmados por Han *et al.*⁽⁶²⁾, que observaram uma associação significativa com a dimensão do tumor ($p=0,05$) e com RE e RP positivos ($p=0,06$). Miyoshi *et al.*⁽⁵²⁾ também observaram uma associação entre o alelo (*TTTA*)_{≥10} (portadoras de dois alelos (*TTTA*)_{≥10}) e a dimensão do tumor ($p<0,05$).

No nosso estudo, verificámos que as mulheres portadoras do alelo (*TTTA*)₁₁ (homozigóticas ou heterozigóticas) apresentaram tumores em estádios mais avançados mas bem diferenciados ($p=0,009$), com RE positivos ($p=0,006$) e sem aumento da expressão de HER2 ($p=0,04$). Por outro lado, a homozigotia para o alelo (*TTTA*)₇ associou-se, de forma significativa, a tumores moderadamente/pouco diferenciados ($p=0,037$; OR=2,15; IC95%=1,04-4,45), com RE negativos ($p=0,04$; OR=2,28; IC95%=1,02-5,10) e com sobre-expressão de HER2 ($p=0,002$; OR=3,52, IC95%=1,56-7,94).

Kristensen *et al.*⁽⁴⁰⁾ estudaram o polimorfismo *CYP19* C¹⁵⁵⁸-T e verificaram que o genótipo *TT* estava significativamente associado a tumores ≥5cm ($p=0,002$; OR=3,12, IC95%=1,80-5,30) e a estádios mais avançados da doença (III e IV) ($p=0,004$; OR=2,09, IC95%=1,29-3,36). Fasching *et al.*⁽⁶³⁾ estudaram o valor prognóstico de três polimorfismos SNPs (entre os quais o *CYP19* C¹⁵⁵⁸-T) em mulheres com cancro da mama, avaliando vários parâmetros clínicos e histopatológicos. Observaram a associação do genótipo *CC* com a sobre-expressão do HER2 ($p=0,046$), de forma independente do estado dos receptores. Este genótipo também se associou a um maior intervalo livre de doença, embora sem repercussões na sobrevivência global. O nosso estudo confirma a associação do genótipo *CC* com o aumento da expressão de HER2 ($p=0,027$; OR=2,49, IC95%=1,10-5,65).

Não temos conhecimento de nenhum estudo publicado sobre a relação do polimorfismo *CYP19* G>A com os factores de prognóstico do cancro da mama. No nosso estudo o genótipo

AA associou-se a tumores mais agressivos: de grau mais elevado ($p=0,007$; $OR=2,93$, $IC95\%=1,30-6,60$), com sobre-expressão do HER2 ($p=0,001$; $OR=3,53$, $IC95\%=1,56-7,99$) e com receptores hormonais negativos, embora estes últimos sem significado estatístico.

Os resultados obtidos para a nossa população, embora diverjam dos de alguns autores, estão de acordo com o desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos. Assim, as variantes alélicas do haplótipo A_1 ($A-(TTTA)7-C$) mostraram associar-se a factores de pior prognóstico, como grau elevado de diferenciação, receptores de estrogénios negativos e sobre-expressão do HER2.

Estão em curso estudos de sobrevivência das doentes que nos irão permitir avaliar se os genótipos identificados são factores de prognóstico independentes ou se apenas se associam aos marcadores já conhecidos. Para a susceptibilidade para o cancro da mama, as variantes alélicas de risco parecem ser distintas enquadrando-se no haplótipo A_2 ($G-(TTTA)10-T$).

Os estudos que tentam correlacionar as variantes polimórficas com a actividade enzimática apresentam, como alelos mais activos, alelos pertencentes a haplótipos diferentes. Assim, o genótipo TT (haplótipo A_2) foi associado, de forma significativa, à presença níveis de mRNA da aromatase intra-tumoral mais elevados^(31,40,47) e à presença de promotor tissular II, específico do ovário ($p=0,004$)⁽⁴⁰⁾. No entanto, também o genótipo AA (haplótipo A_1) foi descrito como potenciador da actividade da aromatase e relacionado com risco de cancro da mama⁽⁵¹⁾ e com um perfil estrogénico⁽³⁵⁾.

Embora nenhum destes estudos nos pareça conclusivo, a verdade é que a avaliação da actividade enzimática tem geralmente melhor correlação funcional, já que o aumento dos níveis de mRNA não corresponde, necessariamente, a um aumento da expressão proteica, dado existirem vários mecanismos de controlo pós-transcrição. A associação por nós encontrada entre o genótipo AA , com a agressividade tumoral, poderia estar dependente do aumento da actividade local da enzima. A correlação entre a actividade intra-tumoral da aromatase e os factores de prognóstico foi sugerida por Zhu et al.⁽⁶⁴⁾, que num estudo com hormonoterapia neo-adjuvante com inibidores da aromatase, constataram uma redução na amplificação do HER2 em tumores HER2 positivos em 41,7% dos casos. É possível, contudo, que nenhum destes polimorfismos tenha significado funcional e que esteja apenas em desequilíbrio de ligação com variantes genéticas deste, ou de genes próximos, verdadeiramente implicados na carcinogénese mamária.

O gene *CYP19* tem sido alvo de estudos de associação noutras doenças crónicas complexas, em cuja etiopatogenia os estrogénios poderão estar implicados. É o caso da doença

de Alzheimer⁽⁶⁵⁻⁶⁸⁾, da hipertensão arterial⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾ e da osteoporose^(35,49,72,73). Os riscos atribuídos aos polimorfismos do *CYP19* e haplótipos descritos em relação a estas doenças, têm valores semelhantes aos encontrados para a susceptibilidade para o cancro da mama (OR de 1,60 a 3,30). A caracterização das alterações funcionais relacionadas com a modificação da expressão ou actividade da aromatase poderá permitir novas abordagens terapêuticas para estas doenças. No entanto, da mesma forma que para o cancro da mama, os resultados dos diferentes estudos são inconsistentes, embora promissores.

Estudos com microarrays em amostras de populações com dimensões variando entre 12013 e 31595 mulheres, identificaram polimorfismos sem significado funcional definido e com OR inferiores a 2, testemunhando a dificuldade na identificação de marcadores genéticos clinicamente relevantes, no âmbito das doenças complexas⁽⁷⁴⁾.

A determinação dos polimorfismos estudados poderá ter impacto na aplicação clínica como marcadores de susceptibilidade e prognóstico para o cancro da mama, permitindo a individualização de medidas preventivas, como o rastreio mais precoce e/ou mais frequente e a selecção de terapêuticas dirigidas, como os inibidores da aromatase.

VI. Conclusões e perspectivas futuras

Os múltiplos estudos que analisaram a possível associação dos diferentes polimorfismos do *CYP19* com o cancro da mama têm apresentado resultados inconsistentes e pouco reprodutíveis. As diferentes magnitudes de risco descritas para os diferentes genótipos, bem como a possível influência nos níveis séricos das hormonas sexuais, devem ser interpretados tendo em conta a baixa penetrância destes polimorfismos e o ténue efeito exercido.

Este estudo permitiu-nos avaliar a relação dos polimorfismos do gene *CYP19* (*CYP19* C¹⁵⁵⁸-T, *CYP19* G>A e (TTTA)_n) com a susceptibilidade para o cancro da mama. O polimorfismo (TTTA)_n com dois alelos ≥10 repetições associou-se a um risco de cancro da mama de 1,9.

Avaliámos, também, a relação destes polimorfismos com factores de prognóstico histopatológicos, constatando uma relação estatisticamente significativa entre os genótipos *CYP19* G>A – AA, *CYP19* C¹⁵⁵⁸-T – CC e (TTTA)_{7/7} com tumores mais agressivos, nomeadamente com grau de diferenciação elevado, receptores de estrogénios negativos e sobre-expressão do HER2.

Embora estes polimorfismos se associem a pequenos aumentos de risco (com OR entre 1,5 e 3,0) são relativamente comuns na população, pelo que, globalmente, o risco de cancro da mama atribuído, pode ser significativo e ter impacto na prestação de cuidados de saúde, sobretudo se considerarmos a associação de vários polimorfismos⁽⁷⁵⁾.

Perspectivas futuras

Apesar dos estudos efectuados até à data serem inconclusivos e inconsistentes, vários dados de ordem experimental, laboratorial e clínicos sugerem o envolvimento da aromatase na carcinogénese mamária.

Face aos resultados dos estudos realizados até à data e aos resultados obtidos no nosso trabalho, seria interessante prosseguir a investigação dos polimorfismos estudados utilizando uma amostra de maior dimensão. Estudos de sobrevivência estão já em curso.

A avaliação de um perfil mais extenso de polimorfismos, com investigação de outros genes, como genes que codificam outras enzimas envolvidas na biossíntese e metabolismo dos estrogénios, poderá permitir uma melhor avaliação do risco.

A avaliação por microarrays dos polimorfismos dos múltiplos genes envolvidos na síntese e metabolismo dos estrogénios poderá estabelecer perfis de risco, quer para o cancro esporádico, quer nas mulheres com estudo genético positivo para genes de elevada penetrância, definindo a melhor estratégia de prevenção e terapêutica, com eventual recurso a terapêuticas hormonais, nomeadamente os inibidores da aromatase.

VII. Bibliografia

- (1) Fiorica JV., 2007, "Breast Diseases". In: DiSaia PJ, Creasman WT, ed. Clinical Gynecological Oncology, Mosby Elsevier; 411-448
- (2) Suspitsin EN, Grigoriev MY, Togo AV, *et al.*, 2002, "Distinct prevalence of the CYP19 $\Delta 3(\text{TTTA})_7$ allele in premenopausal versus postmenopausal breast cancer patients, but not in control individuals". Eur J Cancer 38: 1911-1916
- (3) Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, *et al.*, 1999, "A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk". Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 8: 843-854
- (4) Turnbull C, Rahman N. 2008, "Genetic predisposition to breast cancer: past, present and future". Ann Rev Genom Human Genet 9: 321-345
- (5) Brewster A, Bondy M. "Clinical and molecular epidemiology of breast cancer". In: Ross JR, Hortobagyi GN, ed. Molecular Oncology of Breast Cancer. Jones and Bartlett Publishers, 2005: 34-47
- (6) Pharoah PDP, Antoniou A, Bobrow M, *et al.*, 2002, "Polygenes, risk prediction and targeted prevention of breast cancer". N Engl J Med, 358 (26): 358-426
- (7) Pharoah PDP, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BAJ. 1997, "Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis". Int J Cancer, 71: 800-809
- (8) Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, *et al.*, 2007, "Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility *loci*". Nature 447: 1087-1095
- (9) Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schelegelberger B., 2008, "Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling". Eur J Hum Genet: 1-10
- (10) Raskin L, Lejbkowitz F, Barnett-Griness O, *et al.*, 2009, "BRCA1 Breast cancer risk is modified by CYP19 polymorphisms in Ashkenazi Jews". Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18: 1617-1623
- (11) Burton PR, Tobin MD, Hopper JL., 2005, "Key concepts in genetic epidemiology". Lancet 366: 941-951
- (12) Nakamura Y., 2009, "DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience". J Hum Genet 54: 1-8
- (13) Weber JL, May PE., 1989, "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction". Am J Hum Genet 44: 388-396
- (14) Brookes AJ, 1999, The essence of SNPs. Gene 234: 177-186,
- (15) Feuk L, Carson AR, Scherer SW., 2006, "Structural variation in the human genome". Nat Rev Genet 7: 85-97
- (16) Estivill X, Armengol L., 2007, "Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies". PLoS Genetics 3(10): e190 (1787-1799)
- (17) Tabor HK, Risch NJ, Myers RM., 2002, "Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations". Nat Rev Genet 3: 391-397
- (18) Healey DG., 2006, "Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide". Lancet Neurol 5: 701-707
- (19) National Human Genome Research Institute. Genome-wide Association Studies. 2009, <http://www.genome.gov/20019523>

- (20) Kristensen VN, Kure EH, Erikstein B., *et al.*, 2001, "Genetic susceptibility and environmental estrogen-like compounds". *Mutation Res* 482: 77-82
- (21) Justenhoven C, Hamann U, Schubert F, *et al.*, 2008, "Breast cancer: a candidate gene approach across the estrogen metabolic pathway". *Breast Cancer Res Treat* 108: 137-149
- (22) Dunn BK, Wickerham DL, Ford LG., 2005, "Prevention of hormone-related cancers: breast cancer". *J Clin Oncol* 23: 357-367
- (23) Henderson BE, Ross R, Bernstein L., 1988, "Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture". *Cancer Res* 48 (15): 246-253
- (24) Mitrunem K, Hirvonen A., 2003, "Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism". *Mutat Res* 544: 9-41
- (25) Subramanian A, Salhab M, Mokbel K., 2008, "Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: a review". *Breast Cancer Res Treat* 111: 191-202
- (26) The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group., 2002, "Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies". *J Natl Cancer Inst* 94 (8): 606-616
- (27) Toniolo PJ, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, *et al.*, 1995, "A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women". *J Natl Cancer Inst* 87 (3): 190-196
- (28) Clemons M, Goss P., 2001, "Estrogen and the risk of breast cancer". *N Engl J Med*, 344 (4): 276-285
- (29) Ahsan H, Whittemore AS, Chen Y, *et al.* 2005, "Variants in estrogen-biosynthesis genes *CYP 17* and *CYP 19* and breast cancer risk: a family-based genetic association study". *Breast Cancer Res*, 7 (1): R71-R81
- (30) Yager JD, Davidson NE., 2006, "Estrogen carcinogenesis in breast cancer". *N Engl J Med* 354 (3): 270-282
- (31) Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, *et al.*, 2004, "Polymorphisms associated with sex hormone levels in postmenopausal women". *J Natl Cancer Inst* 96: 936-945,
- (32) Wiebe JP, 2006. "Progesterone metabolites in breast cancer". *Endocrine-Related Cancer* 13: 717-738
- (33) Santer SJ, Pauley RJ, Tait L, *et al.*, 1997, "Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells", *J Clin Endocrinol Metab* 82: 200-208
- (34) Healey CS, Dunning AM, Durocher F, *et al.*, 2000, "Polymorphisms in the human aromatase cytochrome P450 gene (*CYP19*) and breast cancer risk". *Carcinogenesis* 21 (2): 189-193
- (35) Somner J, Mclellan S, Cheung J, *et al.*, 2004, "Polymorphisms in the P450c17 (17-hydroxylase/17,20-lyase) and P450c19 (aromatase) genes – Association with serum sex steroid concentrations and bone mineral density in postmenopausal women". *J Clin Endocrinol Metab* 89 (1): 344-351
- (36) Haiman CA, Stram DO, Pike MC, *et al.*, 2003, "A comprehensive haplotype analysis of *CYP 19* and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort". *Hum Mol Genet* 12 (20): 2679-2692
- (37) Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, *et al.*, 2005, "Human aromatase: gene resequencing and functional genomics". *Cancer Res* 65(23): 11071-11082
- (38) Miller WR, Hawkins RA, Forrest APM., 1982, "Significance of aromatase activity in human breast cancer". *Cancer Res (sup)* 42: 3365-3368

- (39) Harada N, Utsumi T, Takagi Y., 1993, "Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis". *Proc Natl Acad Sci* 90: 11312-11316
- (40) Kristensen VN, Harada N, Yoshimura N, *et al.*, 2000, "Genetic variants of Cyp19 (aromatase) and breast cancer risk". *Oncogene* 19: 1329-1333
- (41) Means GD, Mahendroo MS, Corbin CJ, *et al.*, 1989, "Structural analysis of gene encoding human aromatase cytochrome P 450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis". *J Biol Chem Nov* 15; 264 (32): 19385-19391
- (42) Olson JE, Ingle JN, Ma CX, *et al.*, 2007, "A comprehensive examination of CYP19 variation and risk of breast cancer using two haplotype-tagging approaches". *Breast Cancer Res Treat* 102: 237-247
- (43) Haiman CA, Dossus L, Setiawan VW, *et al.*, 2007. "Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women". *Cancer Res* 67(5): 1893-1897
- (44) Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, Merrill CR., 1991, "Tetranucleotide repeat polymorphism at the human aromatase cytochrome P-450 gene (CYP19)". *Nucleic Acids Res.* 19: 195
- (45) Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, *et al.*, 2000, "A tetranucleotide repeat polymorphism in Cyp19 and breast cancer risk". *Int J Cancer* 87: 204-210
- (46) Baxter SW, Choong DYH, Eccles DM, Campbell IG., 2001, "Polymorphic variation in CYP19 and the risk of breast cancer". *Carcinogenesis* 22 (2): 347-349
- (47) Kristensen VN, Borresen-Dale AL., 2000, "Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism". *Mutation Res.* 323-333
- (48) Kristensen VN, Andersen TI, Lindblom A, *et al.*, 1998, "A rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer". *Pharmacogenetics* 8(1): 43-48
- (49) Tofteng CL, Kindmark A, Brändström H, *et al.*, 2004, "Polymorphisms in the CYP19 and AR Genes – relation to bone mass and longitudinal bone changes in postmenopausal women with or without hormone replacement therapy: The Danish Osteoporosis Prevention Study". *Calcified Tissue Int* 74: 25-34
- (50) Sourdain P, Parker MG, Telford J, Miller WR. 1994, "Analysis of the aromatase cytochrome P450 gene in human breast tumours". *J Mol Endocrinol* 13: 331-337
- (51) Siegelmann-Danieli N, Buetow KH., 1999, "Constitutional genetic variation at the human aromatase gene (Cyp19) and breast cancer risk". *Br J Cancer* 79: 456-463
- (52) Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, *et al.*, 2000, "Breast cancer risk associated with polymorphism in CYP19 in Japanese women". *Int J Cancer* 89: 325-328
- (53) Zhang L, Gu L, Qian B, *et al.*, 2009, "Association of genetic polymorphisms of ER- α and the estradiol-synthesizing enzyme genes CYP17 and CYP 19 with breast cancer risk in Chinese women". *Breast Cancer Res Treat* 114: 327-338
- (54) Okobia MN, Bunker CH, Zmuda JM, *et al.*, 2006, "Simple tandem repeat (TTTA)_n polymorphism in CYP 19 (aromatase) gene and breast cancer risk in Nigerian women". *Journal of Carcinogenesis*, 5: 12, (<http://www.carcinogenesis.com/content/5/1/12>)
- (55) Talbott KE, Gammon MD, Kibriya MG, C *et al.*, 2008, "A CYP19 (aromatase) polymorphism is associated with increased premenopausal breast cancer risk". *Breast Cancer Res Treat* 111: 481-487

- (56) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF., 1988, "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells". *Nucleic Acids Res*, 16(3): 1215
- (57) Miyoshi Y, Noguchi S., 2003, "Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women". *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57: 471-481
- (58) Probst-Hensch NM, Ingles SA, Diep AT, et al. 1999 "Aromatase and breast cancer susceptibility". *Endocrinol Relat Cancer* 6: 165-173
- (59) Kato M, Sekine A, Ohnishi Y, et al., 2006, "Linkage disequilibrium of evolutionarily conserved regions in the human genome". *BMC Genomics*, 7: 326 (1-8)
- (60) Paynter RA, Hankinson SE, Colditz GA, et al., 2005, "CYP19 (Aromatase) haplotypes and endometrial cancer risk". *Int J Cancer* 116: 267-274
- (61) Miyoshi Y, Ando A, Hasegawa S, et al., 2003, "Association of genetic polymorphisms in CYP19 and CYP1A1 with the oestrogen receptor-positive breast cancer risk". *Eur J Cancer* 39: 2531-2537
- (62) Han DF, Zhou X, Hu MB, et al., 2006, "Polymorphisms of estrogen-metabolizing genes and breast cancer risk: a multigenic study". *Chin Med J* 118 (18): 1507-1516
- (63) Fasching PA, Loehberg CR, Strissel PL, et al. 2008 "Single nucleotide polymorphisms of the aromatase gene (CYP19A1), HER2/neu status, and prognosis in breast cancer patients". *Breast Cancer Res Treat* 112: 89-98
- (64) Zhu L, Chow LW, Loo WT, et al. 2004, "HER2/neu expression predicts the response to antiaromatase neoadjuvant therapy in primary breast cancer: subgroup analysis from celecoxib antiaromatase neoadjuvant trial". *Clin Cancer Res* 10: 4639-4644
- (65) Huang R, Poduslo SE, 2006, "CYP19 haplotypes increase risk for Alzheimer's disease". *J Med Genet*;43(8): e42 (1-6)
- (66) Iivonen S, Corder E, Lehtovirta M, et al., 2004, "Polymorphisms in the CYP19 gene confer increased risk for Alzheimer disease". *Neurology* (62): 1170-1176
- (67) Martin ER, Lai EH, Gilbert JR, et al., 2000, "SNPping away at complex diseases: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease". *Am J Hum Genet*; 67(2): 383-394
- (68) Hiltunen M, Iivonen S, Soininen H, 2006, "Aromatase enzyme and Alzheimer's disease". *Minerva Endocrinol.* 31(1): 61-73
- (69) Shimodaira M, Nakayama T, Sato N, et al., 2008, "Association Study of Aromatase Gene (CYP19A1) in Essential Hypertension". *Int J Med Sci* 5: 29-35
- (70) Peter I, Kelley-Hedgpeath A; Fox CS, et al., 2008 "Variation in estrogen-related genes associated with cardiovascular phenotypes and circulating estradiol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate levels". *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jul;93(7):2779-2785
- (71) Peter I, Shearman AM; Zucker DR; et al., 2005, "Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study". *J Hypertens* 23(12): 2193-2200
- (72) Riancho JA, Valero C, Naranjo A, et al., 2007, "Identification of an Aromatase Haplotype That Is Associated with Gene Expression and Postmenopausal Osteoporosis". *J Clin Endocrinol Metab* 92 (2): 660-665
- (73) Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, et al., 2006, "Robust and Comprehensive Analysis of 20 Osteoporosis Candidate Genes by Very High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Screen Among 405 White Nuclear Families Identified Significant Association and Gene-Gene Interaction". *J Bone Miner Res.* 21(11): 1678-1695

- (74) The Breast Cancer Association Consortium, 2006, "Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the breast cancer association consortium". *J Natl Cancer Inst* 98: 1382-1396
- (75) Weber BL, Nathanson KL, 2000, Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer* 36: 1193-1199

VIII. Apêndice

Abreviaturas

A	adenina
AP-1	proteína activadora 1
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated gene</i>
<i>BRCA 1</i>	<i>breast cancer Type 1 susceptibility protein</i>
<i>BRCA 2</i>	<i>breast cancer Type 2 susceptibility protein</i>
<i>BRIP1</i>	<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>
<i>CDH1</i>	<i>cadherin 1, type 1, e-caderina</i>
<i>CCDN1</i>	ciclina D1
<i>CHEK2</i>	<i>human gene CHK2 checkpoint homolog</i>
CNV	<i>copy number variation</i>
<i>COMT</i>	catechol- <i>O</i> -methyl transferase
<i>CYP1A1</i>	<i>cytochrome P450, subfamily IA, polypeptide 1</i>
<i>CYP2D6</i>	<i>cytochrome P450, subfamily IID, polypeptide 6</i>
<i>CYP2E1</i>	<i>cytochrome P450, subfamily IIE, polypeptide 1</i>
<i>CYP17</i>	<i>cytochrome P450, subfamily XVII</i>
<i>CYP19</i>	<i>cytochrome P450, subfamily XIX</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAases	enzimas que hidrolisam o DNA
dNTP's	desoxirribonucleotídeos Fosfatados dNTP's
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
6-FAM	<i>6-carboxyfluorescein</i>
FSH	hormona foliculoestimulante
G	guanina
<i>GSTM1</i>	<i>glutathione S-transferase, mu-1</i>
<i>GSTP1</i>	<i>glutathione S-transferase, pi-1</i>
<i>GSTT1</i>	<i>glutathione S-transferase, theta-1</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
<i>HRAS-1</i>	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

IGEPAL	polyoxyethylene nonyl phenol
IMC	índice de massa corporal
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético dissódico
<i>NAT2</i>	<i>N-acetyltransferase 2</i>
<i>NQO1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1,</i>
p	braço curto de um cromossoma
<i>PALB2</i>	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PBS	tampão fosfato salino
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>PHB</i>	<i>human prohibitin gene</i>
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog
q	braço longo de um cromossoma
RE	receptores de estrogénios
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNAases	enzimas que catalisam a degradação do RNA
RP	receptores de progesterona
<i>RsaI</i>	enzima de restrição com origem na <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
rs10046	polimorfismo <i>CYP19 C¹⁵⁵⁸T</i>
rs700518	polimorfismo <i>CYP19 G>A</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SHBG	<i>sex hormone binding globulin</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPSS	statistical package for the social sciences
<i>STK11</i>	serine/threonine kinase family gene; 11
STR	<i>short tandem repeat</i>
<i>SULT1A1</i>	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1</i>
T	timina
TET	tetrachlorofluorescina
<i>TP53</i>	tumor protein 53

Tris-HCL	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane - hydrochloric acid</i>
<i>(TTTA)ⁿ</i>	polimorfismo por repetição do tetranucleótido (TTTA)
UTR	untranslated region
<i>Val</i>	valina
<i>VNTR</i>	<i>Variable number tandem repeats</i>
<i>XRCC1</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1</i>
<i>XRCC3</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3</i>

As unidades de medida foram baseadas no sistema internacional de unidades.