

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Fatores de risco para câncer de mama e polimorfismos nos genes *ER*, *PR* e *STK15* em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre.

Juliana Giacomazzi

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Ashton-Prolla

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Dissertação de Mestrado

2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Fatores de risco para câncer de mama e polimorfismos nos genes *ER*, *PR* e *STK15* em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre.

Juliana Giacomazzi

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ashton-Prolla

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

XXXX Giacomazzi, Juliana

Fatores de risco para câncer de mama e polimorfismos genéticos nos genes *ER*, *PR* e *STK15* em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre/ Juliana Giacomazzi; orient. Patrícia Ashton-Prolla – Porto Alegre, 2008.

XXX f.: il.

Dissertação. (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Orientador: Ashton-Prolla, Patricia

APRENDER

Clovis Wannmacher

Quantas coisas juntos aprendemos,
o labirinto da vida explorando,
um novo caminho buscando,
de início não mais que suspeitado.
Um, ansioso no aventurar,
outro, experiente no andar,
juntos a vida desvendando.

Ao final, o labirinto vencido,
a tarefa enfim concluída,
na boca um sabor de sonata
a quatro mãos construída.
E na hora da despedida,
quem sabe um segundo encontro
na busca de um novo caminho.

Voltamos o olhar sobre os passos
e já nenhum de nós é o mesmo.
Qual de nós aprendeu mais,
quem de nós mais ensinou?

Emprestei-te as minhas pernas,
de tanto andar já cansadas,
viciadas nas mesmas estradas,
já tantas vezes trilhadas.
Tomei-te a juventude indomada,
o brilho permanente do olhar,
a força incansável dos braços,
a firmeza do primeiro caminhar.

Ensinar e aprender, aprender e ensinar:
uma mesma e única transformação
para quem sabe ao outro se entregar
e viver a vida com amor e paixão.

O presente trabalho foi resultado de um estudo colaborativo entre os Laboratórios de Medicina Genômica e Identificação Genética (Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e a Coorte de Rastreamento Mamográfico Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA), projeto este resultado de uma parceria entre o Hospital Moinhos de Vento, o Instituto da Mama do Rio Grande do Sul e a Secretaria de Saúde de Porto Alegre, do qual participam 9218 mulheres provenientes de 19 unidades básicas de saúde de Porto Alegre. Os estudos foram orientados pela Profa. Dra. Patrícia Ashton-Prolla e pelo Prof. Dr. Roberto Giugliani. A parte experimental foi realizada nos Laboratórios de Medicina Genômica e Identificação Genética e a parte clínica realizada junto à equipe do NMPOA. O presente trabalho foi realizado com fomento recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saude no. 06/2005, processo 400949/2005-9; Susan G Komen for the Cure (population specific grant number POP0403033) e Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA (projeto número 05-182). Patricia Ashton-Prolla é bolsista de produtividade em pesquisa nível 2 do CNPq. Juliana Giacomazzi recebeu uma bolsa de mestrado CAPES.

Às maravilhosas Equipes
do Laboratório de Medicina Genômica
e Núcleo Mama Porto Alegre.

AGRADECIMENTOS

Às pacientes pela confiança e disponibilidade em participar do projeto.

À Professora Patrícia Ashton-Prolla, pelo respeito, exemplo absoluto de seriedade profissional. Pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos para a vida.

Ao Professor Roberto Giugliani, pela serenidade, confiança, atenção e sabedoria. Pelo exemplo de professor, administrador e pesquisador.

À Professora Maira Caleffi, pela oportunidade de trabalhar e aprender ao teu lado desde minha graduação. Pela amizade e exemplo de força, determinação e luta pela causa câncer de mama.

Ao Professor Clovis Milton Duval Wannmacher, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, desde o segundo semestre da faculdade. Pelas palavras sábias e sinceras.

Aos colegas e amigos do Núcleo Mama Porto Alegre, pela competência, apoio e amor compartilhado em equipe pelo projeto de Rastreamento Mamográfico Núcleo Mama Porto Alegre, em especial ao Ademar Bedin Junior, Giovana Skonieski e Marta Dornelles.

À Professora Suzi Camey pela dedicação total ao projeto, paciência e amizade, e a estudante de estatística Aishameriane Schmidt pela colaboração nas muitas análises estatísticas dos resultados.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Medicina Genômica:

Carlos Eduardo Pitroski, Cristina Rossi, Liliane Todeschini e Patricia Izetti Ribeiro pelo carinho e atenciosidade.

À Edenir Inêz Palmero pela amizade e por ter sido peça fundamental para o meu ingresso no Grupo Genética e Câncer.

À Ernestina Aguiar pela ajuda e compreensão na fase final da minha graduação, envolvida com prova da UFRGS, FFFCMPA, TCC, estágio curricular e início do “Projeto Polimorfismos”. Pelo coleguismo, simplicidade e amizade.

À Ingrid Petroni Ewald e Silvia Liliana Cossio pela amizade e alegria contagiante de ambas, ajuda nas horas difíceis e acima de tudo pelo companheirismo.

À Jamile Abud pela meiguice, sinceridade e ajuda com os seminários.

À Patrícia Koehler dos Santos pela prestatividade e “ajudas genéticas”.

À Equipe do Serviço de Genética Médica pela eficiência e suporte total para todas as atividades.

Aos coordenadores do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por propiciar um ambiente maravilhoso de trabalho e pesquisa, e ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela competência e comprometimento com os projetos de pesquisa.

À Dra. Têmis Maria Félix pelas ajudas com o PCR em tempo real.

À Professora Maria Luiza Saraiva Pereira por disponibilizar a realização de experimentos no Laboratório de Identificação Genética.

À Professora Lavínia Schüller-Faccini pela ajuda durante o andamento do projeto.

Ao Hugo Bock pela dedicação ao projeto, auxiliando nos experimentos em PCR Tempo Real e pela amizade.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, em especial ao Professor e Coordenador deste Programa, Prof. Edison Capp.

À Ana Mardini, Gabriela H. Cibeira e Giovana Fontanella pela amizade.

À minha tia, Clair Eunice Pitt, que apesar da incessante luta contra o câncer de mama, foi vencida pela doença. Por ter sido um dos motivos do meu encaminhamento na pesquisa em câncer de mama.

Ao meu irmão Cézar Giacomazzi Filho por seu jeito carinhoso, atencioso, mas desligado, e acima de tudo pela pureza que há em seu coração.

Ao meu irmão Marcelo Giacomazzi pelo companheirismo ao longo desses anos todos morando em Porto Alegre, pela atenção e amor 100%.

Ao meu pai Cézar Giacomazzi, pelo amor incondicional, confiança, amizade, respeito e por ser à base de tudo em minha vida.

À minha mãe Elizabethe Pitt Giacomazzi, pelo exemplo de mãe, mulher, professora e pesquisadora. Por ser à base de tudo em minha vida.

Ao meu anjo da guarda: Muito Obrigada!

ESTRUTURA

Após os itens INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS, esta dissertação apresenta dois manuscritos redigidos nos moldes dos periódicos a que foram submetidos (*Genetics and Molecular Biology* e *The Breast Journal*). Os manuscritos estão organizados em capítulos no item ARTIGOS CIENTÍFICOS. Introdução, material e métodos, resultados e discussão encontram-se nos próprios artigos. As referências bibliográficas de cada artigo aparecem no formato de cada um dos periódicos a que serão submetidos.

O item CONSIDERAÇÕES FINAIS contém interpretações e comentários gerais.

O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se somente às citações que aparecem na revisão da literatura.

O item ANEXOS contém dados da pesquisa bibliográfica, protocolos, fichas de coleta de dados utilizados, documentos do projeto e artigos desenvolvidos durante o período do mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE GRÁFICOS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1. Epidemiologia do Câncer de Mama	03
2.2. Fatores de Risco para Câncer de Mama	05
2.2.1. Idade.....	05
2.2.2. Etnia	06
2.2.3. Fatores Reprodutivos e Hormonais	06
2.2.3.1. Menarca e menopausa	06
2.2.3.2. Gestação e amamentação.....	06
2.2.3.3. Hormônios Exógenos.....	07
2.2.4. Fatores Ambientais, Hábitos e Costumes de Risco.....	08
2.2.4.1. Agrotóxicos	08
2.2.4.2. Etilismo	08
2.2.4.3. Tabagismo	09
2.2.4.4. Obesidade	09
2.2.5. História Pessoal de Câncer de Mama	10
2.2.6. História Familiar de Câncer de Mama	10
2.3. Modelos de Estimativa de Risco para Câncer de Mama	11
2.3.1. Modelo de Gail.....	12
2.3.2. Modelo de Claus	12
2.3.3. Modelo de Tyrer-Cuzick.....	13
2.4. Rastreamento do Câncer de Mama.....	14
2.4.1. Classificação Mamográfica.....	15
2.4.2. Categorias de Densidade Mamográfica	16
2.5. Genética do Câncer de Mama.....	17
2.6. Polimorfismos Genéticos associados ao Câncer de Mama: Genes envolvidos no Metabolismo de Esteróides	22
2.6.1. Gene do Receptor de Estrogênio	22
2.6.1.1. Polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i>	28
2.6.1.2. Polimorfismo <i>ERα-351 XbaI</i>	29
2.6.1.3. Haplótipos de <i>ERα-397 PvuII - ERα-351 XbaI</i>	30
2.6.2. Gene do Receptor de Progesterona.....	31
2.6.2.1. Polimorfismo <i>PR PROGINS</i>	34
2.7. Polimorfismo Genéticos associados ao Câncer de Mama: Genes envolvidos com a regulação do ciclo celular	37
2.7.1. Gene da Serina-treonina Quinase	37
2.7.1.1. Polimorfismo <i>STK15 F31I</i>	40

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	43
3.1. Justificativa.....	43
3.2. Objetivos.....	44
3.2.1 Objetivo Geral.....	44
3.2.2 Objetivos Específicos.....	44
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
5. MANUSCRITOS	59
5.1. Manuscrito 1: <i>Prevalence of breast cancer risk factors and ERα-397 PvuII C/T e ERα-351 A/G polymorphisms and PR PROGINS polymorphisms in women submitted to mammographic screening in Southern Brazil</i>	59
5.2. Manuscrito 2: <i>Prevalence of STK15 F31I polymorphism and its relationship with breast cancer risk factors in women submitted to mammographic screening in Southern Brazil</i>	84
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
7. ANEXOS	101
7.1. Freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados.....	102
7.1.1. Polimorfismo ER α -397 PvuII C/T.....	102
7.1.2. Polimorfismo ER α -351 XbaI A/G.....	103
7.1.3. Polimorfismo PR PROGINS.....	104
7.1.4. Polimorfismo STK15 F31I.....	105
7.2. Haplótipos de ER α -397 PvuII - ER α -351 XbaI.....	106
7.3. Cálculos de equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	108
7.4. Protocolo de extração de DNA.....	110
7.5. Protocolo de PCR do polimorfismo PROGINS do Receptor de Progesterona.....	112
7.6. Protocolo de PCR dos polimorfismos ER α -397 PvuII C/T, ER α -351 XbaI A/G e STK15 F31I.....	114
7.7. Seqüências das sondas utilizadas para análise dos polimorfismos analisados por PCR Tempo Real.....	114
7.7.1. Polimorfismo ER α -397 PvuII C/T.....	114
7.7.2. Polimorfismo ER α -351 XbaI A/G.....	114
7.7.3. Polimorfismo STK15 F31I.....	114
7.8. Gráficos de discriminação alélica e amplificação dos polimorfismos analisados em PCR Tempo Real.....	115
7.8.1. Polimorfismo ER α -397 PvuII C/T.....	115
7.8.2. Polimorfismo ER α -351 XbaI A/G.....	117
7.8.3. Polimorfismo STK15 F31I.....	119
7.9. Carta de Aprovação do Projeto no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	122
7.10. Carta de Aprovação do Projeto no Instituto de Educação e Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento.....	123
7.11. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	125
7.12. Ficha de Levantamento de Dados do Núcleo Mama Porto Alegre.....	127
7.13. Ficha de Anamnese do Núcleo Mama Porto Alegre.....	128

7.14. Artigo: <i>Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in Southern Brazil</i>	131
7.15. Artigo: <i>Detection of R337H, a germline mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil</i>	155

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	-	Contracepção oral
<i>BIRADS</i>	-	<i>Breast Image Reporting and Data System</i>
<i>BRCA1</i>	-	<i>Breast Cancer Gene 1</i>
<i>BRCA2</i>	-	<i>Breast Cancer Gene 2</i>
CM	-	Câncer de mama
DP	-	Desvio Padrão
<i>ER</i>	-	Receptor de estrogênio
H-W	-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IMC	-	Índice de massa corporal
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
NMPOA	-	Núcleo Mama Porto Alegre
<i>PCR</i>	-	Reação da polimerase em cadeia
<i>PR</i>	-	Receptor de progesterona
PSF	-	Programa da Saúde da Família
<i>OMIM</i>	-	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<i>OR</i>	-	<i>Odds ratio</i>
<i>RFLP</i>	-	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RR	-	Risco Relativo
RS	-	Estado do Rio Grande do Sul
<i>SNP</i>	-	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>STK15</i>	-	Gene da serina-treonina quinase
TRH	-	Terapia de reposição hormonal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Variáveis utilizadas para estimar o risco de desenvolver câncer de mama nos Modelos de Claus, Gail e Tyrer-Cuzick.	12
Tabela 2 –	Classificação de exame de mamografia pelo Sistema <i>BIRADS</i>	16
Tabela 3 –	Categorias de densidade da mama.	16
Tabela 4 –	Genes de susceptibilidade ao câncer de mama e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem câncer de mama.....	21
Tabela 5 –	Estudos de associação do polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i> com câncer de mama /ou fatores de risco para a doença.	26
Tabela 6 –	Estudos de associação do polimorfismo <i>ERα-397 XbaI A/G</i> com câncer de mama /ou fatores de risco para a doença	27
Tabela 7 –	Estudos de associação do polimorfismo <i>PROGINS</i> com câncer de mama /ou fatores de risco para a doença.....	33
Tabela 8 –	Estudos de associação do polimorfismo <i>STK15 F31I</i> com câncer de mama /ou fatores de risco para a doença.....	39
Tabela 9 –	Polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i> em mulheres com câncer de mama.....	102
Tabela 10 –	Polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i> em mulheres sem câncer de mama.....	102
Tabela 11 –	Polimorfismo <i>ERα-397 XbaI A/G</i> em mulheres com câncer de mama.....	103
Tabela 12 –	Polimorfismo <i>ERα-397 XbaI A/G</i> em mulheres sem câncer de mama.....	103
Tabela 13 –	Polimorfismo <i>PROGINS</i> em mulheres com câncer de mama.....	104
Tabela 14 –	Polimorfismo <i>PROGINS</i> em mulheres sem câncer de mama.....	104
Tabela 15 –	Polimorfismo <i>STK15 F31I</i> em mulheres com câncer de mama.	105
Tabela 16 –	Polimorfismo <i>STK15 F31I</i> em mulheres sem câncer de mama	105
Tabela 17 –	Frequência dos haplótipos <i>ERα-397 PvuII - ERα-397 XbaI</i>	106
Tabela 18 –	Frequência dos haplótipos <i>ERα-397 PvuII - ERα-397 XbaI</i> entre brancas e não-brancas na amostra estudada.....	107
Tabela 19 –	Cálculo do Equilíbrio Hardy-Weinberg na amostra total de mulheres do estudo.	108
Tabela 20 –	Cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres brancas do estudo	108
Tabela 21 –	Cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres não-brancas do estudo	109
Tabela 22 –	Componentes para a reação de PCR do polimorfismo <i>PROGINS</i> ...	112
Tabela 23 –	Componentes para a reação de PCR em tempo real	114

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura, domínios funcionais e polimorfismos descritos do gene ER α24
- Figura 2 – Estrutura das isoformas *PR-A* e *PR-B* do receptor de progesterona..32
- Figura 3 – Localização dos polimorfismos de base única *V660L*, *H770H* e da inserção *Alu* que caracterizam o complexo polimórfico *PROGINS*.....34
- Figura 4 – Foto do gel de agarose contendo os possíveis genótipos para o polimorfismo *PROGINS* do gene do receptor de progesterona.113

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Discriminação alélica do polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i>	115
Gráfico 2 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>CC</i> do polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC.....	115
Gráfico 3 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>TT</i> do polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com FAM.....	116
Gráfico 4 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>CT</i> do polimorfismo <i>ERα-397 PvuII C/T</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM.....	116
Gráfico 5 –	Discriminação alélica do polimorfismo <i>ERα-397 XbaI A/G</i>	117
Gráfico 6 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>AA</i> do polimorfismo <i>ERα-351 XbaI A/G</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC.....	117
Gráfico 7 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>GG</i> do polimorfismo <i>ERα-351 XbaI A/G</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com FAM.....	118
Gráfico 8 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>AG</i> do polimorfismo <i>ERα-351 XbaI A/G</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM.....	118
Gráfico 9 –	Discriminação alélica do polimorfismo <i>STK15 F31I</i>	119
Gráfico 10 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>TT</i> do polimorfismo <i>STK15F31I</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC.....	119
Gráfico 11 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>AA</i> do polimorfismo <i>STK15 F31I</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com FAM.	120
Gráfico 12 –	Amplificação de uma amostra (genótipo <i>AT</i> do polimorfismo <i>STK15 F31I</i>) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM.....	120

RESUMO

O câncer de mama é uma doença multifatorial causada pela combinação de fatores de risco genéticos e ambientais. Polimorfismos genéticos de baixa penetrância têm sido associados a esta doença, porém existem poucos estudos publicados sobre a prevalência destes na população brasileira. No presente estudo, determinamos a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos *ERα-397 PvuII C/T*, *ERα-351 XbaI A/G*, *PR PROGINS* e *STK15 F31I* e investigamos a relação destes com fatores de risco estabelecidos para câncer de mama. Foram estudadas 750 mulheres sem câncer de mama, envolvidas em um programa de rastreamento mamográfico no Sul do Brasil, uma região com altos índices de incidência da doença. As frequências genotípicas do polimorfismo *PROGINS* não foram significativamente diferentes das encontradas em populações brasileiras e não-brasileiras. A distribuição dos genótipos de *ERα-397 PvuII C/T*, *ERα-351 XbaI A/G* e *STK15 F31I*, no entanto, foram significativamente diferentes da maioria dos estudos previamente publicados, enfatizando a necessidade de análises de populações específicas para avaliação do impacto de polimorfismos de baixa penetrância no risco para câncer de mama. Adicionalmente, a distribuição dos haplótipos de *ERα* (*ERα-397 PvuII - ERα-351 XbaI*) foram significativamente diferentes das descritas em outras populações. A média estimada do risco de desenvolver câncer de mama ao longo da vida na amostra estudada foi de 7.8%, a maioria (97.5%) das mulheres apresentavam achados normais ao exame de mamografia (*BIRADS* 1 e 2), e nenhum fator de risco reprodutivo para câncer de mama foi identificado na amostra. No entanto, a média do índice de massa corporal foi 29.6 e 41.1% das mulheres apresentavam índice de massa corporal ≥ 30 . Ao analisamos a relação entre os três

polimorfismos e fatores de risco já estabelecidos, as seguintes associações estatisticamente significativas foram encontradas: (a) genótipo *GG* de *ERα-351* e menarca ≥ 14 anos, (b) genótipos *A2A2* e *A1A2* de *PR PROGINS* e maior estimativa de risco de desenvolver câncer de mama em 5-anos em mulheres pós-menopáusicas; (c) genótipos *A2A2* e *A1A2* *PR PROGINS* e maior índice de massa corporal em mulheres pós-menopáusicas; (d) genótipo *AT* e *AA* de *STK15 F31I* e densidade mamográfica moderadamente densa (tecido fibroglandular em 50-75% do tecido mamário) em mulheres pré-menopáusicas; (e) genótipo *TT* de *STK15 F31I* e mamas menos densas (tecido fibroglandular em 0-50% do tecido mamário) em mulheres pré-menopáusicas e (f) genótipo *TT* de *STK15 F31I* e idade da menarca ≥ 12 anos. Estudos de caso-controle adicionais são necessários para melhor compreensão da relação entre estes e outros polimorfismos e risco para câncer de mama na população brasileira.

ABSTRACT

Breast cancer is a multifactorial disease caused by a combination of genetic and environmental risk factors. Highly prevalent low-penetrance genetic polymorphisms have been associated with an increased risk of developing the disease. Only a few studies have been published about the prevalence of such polymorphisms in the highly heterogeneous Brazilian population. In the present study, we have determined the allelic and genotypic frequencies of the *ER α -397 PvuII C/T*, *ER α -351 XbaI A/G*, *PR PROGINS* and *STK15 F31I* polymorphisms and investigated their relationship with established breast cancer risk factors. We studied 750 breast cancer-unaffected women enrolled in a mammographic screening program in Southern Brazil, a region with particularly high breast cancer incidence rates. Genotypic frequencies for *PROGINS* were not significantly different from previous studies in Brazilian and non-Brazilian individuals. The distribution of *ER α -397 PvuII C/T*, *ER α -351 XbaI A/G* and *STK15 F31I* genotypes, however, was significantly different from most of the previously published reports, emphasizing the need for population-specific analyses in evaluating the impact of low-penetrance gene polymorphisms on breast cancer risk. Furthermore, the distribution of *ER α* haplotypes using the *ER α -397 PvuII C/T* and *ER α -351 XbaI A/G* polymorphic markers was also distinct from that described in other populations. The mean estimated lifetime risk of developing breast cancer in the sample was 7.8%, most of the women (97.5%) had normal mammographic image results (*BIRADS* 1 and 2) and no significant reproductive risk factors for breast cancer were identified in the sample. However, mean body mass index was 29.6 and 41.1% of the women had a body mass index ≥ 30 . When analyzing the relationship between the three polymorphisms

and other established breast cancer risk factors the following significant associations were found between: (a) *ER α* -351 *GG* genotype and menarche \geq 14 years; (b) *PROGINS* *A2* allele and higher mean estimated 5-year risk of developing breast cancer in postmenopausal women; (c) *A1A2* and *A2A2* genotypes and higher mean body mass index in postmenopausal women; (d) *STK15 F31I* *AT* and *AA* genotypes and moderately dense (50-75% of the breast with fibroglandular tissue) in premenopausal women; (e) *STK15 F31I* *TT* genotype and less dense (0-50% of the breast with fibroglandular tissue) in premenopausal women and (f) *STK15 F31I* *TT* genotype and later age at menarche (\geq 12 years). Additional case-control studies are necessary to clarify the relationship between this and other polymorphisms and breast cancer risk in the Brazilian population.

1. INTRODUÇÃO

Lesões adquiridas ou herdadas no material genético de uma célula podem conferir à mesma uma série de propriedades que culminam em uma vantagem de crescimento e proliferação celular, dando origem a clones de células-filhas que escapam dos controles normais de divisão e diferenciação celular. A isto denomina-se “câncer” (Fidler *et al.* 1997).

O câncer é uma das patologias mais antigas da humanidade e uma das principais causas de óbito em todo o mundo nos dias de hoje. A cada ano, a doença é diagnosticada em aproximadamente dez milhões de indivíduos (Organização Mundial da Saúde 2007).

A incidência do câncer permanece ascendente no Brasil, como em todo o mundo, o que pode ser considerado um resultado direto das grandes transformações globais nas últimas décadas, que alteraram a situação de saúde da população pela urbanização acelerada, pelos novos hábitos de vida e padrões de consumo (Instituto Nacional do Câncer 2007).

O Ministério da Saúde estimou para 2008 a ocorrência de 470 mil novos casos de câncer no Brasil. Os tipos de câncer que mais acometem a população brasileira, à exceção do câncer de pele não-melanoma, são os tumores de próstata, pulmão e estômago no sexo masculino e de mama, colo de útero e cólon no sexo feminino (Instituto Nacional do Câncer 2008).

No Brasil, o câncer de mama (CM) é um agravante no quadro da saúde pública, representando aproximadamente 20% do total dos diagnósticos de câncer e 15% das mortes por câncer no país (Instituto Nacional do Câncer 2008).

O Rio Grande do Sul (RS) apresenta uma das maiores taxas de incidência e mortalidade por CM do Brasil. No Estado o CM é a primeira causa de óbito por

câncer em mulheres entre 30-69 anos de idade (Instituto Nacional do Câncer 2008). A capital do Estado, Porto Alegre, também registra taxas surpreendentemente elevadas de incidência e mortalidade pela doença (Brito *et al.* 2008). Não existe uma explicação clara para as altas taxas de incidência de CM no RS e em Porto Alegre. É provável que resulte de múltiplos fatores, incluindo aspectos sociais, culturais, ambientais e genéticos.

A caracterização da população quanto a fatores de risco para CM previamente descritos na literatura e o estudo de polimorfismos relacionados à doença são ferramentas que poderão ter implicação direta e de grande importância na análise da suscetibilidade individual ao CM, no estudo da resposta a diversas drogas e possivelmente no prognóstico da doença.

Com base nisso, este estudo foi proposto para verificar a frequência de alguns polimorfismos em genes de baixa penetrância previamente associados a proteção ou risco para CM e de fatores de risco para a doença em uma amostra populacional participante de um programa de rastreamento mamográfico anual no Sul do Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Epidemiologia do Câncer de Mama

Mundialmente, o CM é o tumor mais freqüente em incidência e mortalidade no sexo feminino, correspondendo a 22% de todos os casos de câncer em mulheres, e 26% dos casos em países desenvolvidos, correspondendo a mais de duas vezes a ocorrência de câncer em mulheres em qualquer outro órgão (Tavassoli *et al.* 2003).

Em países desenvolvidos, houve um aumento persistente na incidência de CM, acompanhado pela redução da mortalidade na faixa etária maior que 50 anos, provavelmente devido à garantia de acesso à saúde e à adoção de políticas de detecção precoce do tumor (Tavassoli *et al.* 2003).

As áreas que apresentam maior risco de desenvolver CM são as regiões desenvolvidas do Norte da América, Europa e Austrália, onde 6% das mulheres desenvolvem CM invasivo antes dos 75 anos de idade. O risco para a doença é menor em regiões menos desenvolvidas como as do Sub-Saara Africano, Sul e Norte da Ásia, incluindo Japão, onde a probabilidade de desenvolver CM até os 75 anos de idade é um terço da probabilidade quando comparado a países desenvolvidos (Chu *et al.* 1996).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o aumento da incidência está acompanhado por um aumento da mortalidade atribuído principalmente, ao atraso no diagnóstico e implementação de terapêutica adequada (Instituto Nacional do Câncer 2008).

As maiores taxas de incidência e mortalidade por CM são observadas nos Estados brasileiros considerados economicamente mais desenvolvidos, em especial nas regiões Sul e Sudeste. Existem alguns possíveis fatores de risco em comum, observados nestas regiões, como o predomínio de indivíduos de origem caucasiana,

menor número médio de filhos, gestações iniciadas em idades mais avançadas, melhor nível socioeconômico e maior uso de terapia de reposição hormonal (Wünsch *et al.* 2002; Ward *et al.* 2004).

Segundo estimativas para 2008, o Estado com maior incidência da doença é o Rio de Janeiro, com 92.77 casos a cada 100.000 mulheres, seguido pelo Rio Grande do Sul (RS) com previsão de 85.5 casos a cada 100 000 mulheres e pelo Estado de São Paulo com 72.5 casos a cada 100 000 mulheres (Instituto Nacional do Câncer 2008).

O RS representa aproximadamente 7% da área nacional e tem aproximadamente 10 milhões de habitantes. É considerado o Estado brasileiro com maior expectativa de vida (73.4 anos), superior à média brasileira de 69.0 anos, e os idosos (≥ 60 anos) representam cerca de 10% da população. Quando comparado aos outros Estados do país, recebeu um número significativo de imigrantes europeus e teve uma contribuição menor de nativos (índios) e africanos. Esses dados epidemiológicos têm relevância para a discussão das altas taxas de incidência de CM nesse Estado, pois é sabido que a incidência desta neoplasia aumenta com a idade e difere entre grupos étnicos (Hallal *et al.* 2001; Ministério da Saúde 2003; Gonçalves *et al.* 2006).

Porto Alegre, a capital do RS, tem 496.1 km² de extensão, distribuída entre a parte continental de 452.7 km² e um conjunto de ilhas de 43.4 km², sendo que cerca de 97% da população vive em áreas urbanas (~1.321,000 habitantes) (Observatório da cidade de Porto Alegre). A cidade apresenta índices alarmantes de incidência da doença, estando previstos para 2008, 119.72 casos a cada 100.000 mulheres, enquanto que a estimativa nacional é de 51.0 novos casos a cada 100.000 mulheres (Instituto Nacional do Câncer 2008).

Dados populacionais recentes relataram que Porto Alegre é a capital brasileira que apresenta o maior percentual de estudantes de 12 a 16 anos tabagistas, e que o RS é um dos Estados com o maior número de trabalhadores expostos a agentes carcinogênicos (indústrias de alumínio, couro, coquearias, madeira, fundição e borracha). Também, é o que apresenta a maior prevalência de excesso de peso, aproximadamente metade da população com mais de 20 anos de idade possui índice de massa corporal (IMC) maior que 25 kg/m² (Instituto Nacional do Câncer 2007).

2.2. Fatores de Risco para Câncer de Mama

O CM é considerado uma doença multifatorial, sendo os fatores de risco para a doença de natureza hormonal, genética e ambiental. Os principais fatores de risco conhecidos para a doença estão descritos em maiores detalhes a seguir.

2.2.1. Idade

A incidência de CM aumenta com a idade, alcançando pouco mais de 10 casos a cada 100.000 mulheres entre os 20 e 30 anos de idade e mais de 200 casos a cada 100.000 mulheres com mais de 60 anos de idade (Ries *et al.* 2002).

A doença é raramente encontrada em mulheres com menos de 25 anos de idade e a média de idade ao diagnóstico é de 64 anos. Porém, a correlação entre a idade e aumento da doença não é linear, havendo aumento da incidência de CM em mulheres jovens e, diminuição durante a menopausa e logo após esta, e finalizando novamente em um aumento da incidência alguns anos após a menopausa (*American Cancer Society* 2007).

2.2.2. Etnia

A incidência e mortalidade por CM variam consideravelmente entre diferentes grupos étnicos e raciais (Ghafoor *et al.* 2003). A incidência é maior entre os caucasianos e afro-americanos, intermediária entre hispânicos e ameríndios, e mais baixa entre os asiáticos (American Cancer Society 2007). No Brasil, a miscigenação da população provavelmente influi na incidência da doença (Hallal *et al.* 2001).

Estudos sugerem que mulheres judias, especialmente aquelas com história familiar de primeiro grau de CM, apresentam quase quatro vezes mais chance de desenvolver a doença (Egan *et al.* 1996).

2.2.3. Fatores Reprodutivos e Hormonais

2.2.3.1. Menarca e menopausa

A menarca com idade precoce (antes dos 11 anos), a menopausa tardia (≥ 54 anos) e muitos (≥ 420) ciclos ovulatórios ininterruptos estão associados a aumento no risco para CM (Henderson *et al.* 1985). Mulheres com a menarca antes dos 11 anos de idade possuem um risco cerca de 20% maior de desenvolver CM ao longo da vida, em comparação com aquelas com mais de 14 anos de idade (Pike *et al.* 1981).

Tanto a menarca precoce como a menopausa tardia, aumentam o risco em duas vezes para CM provavelmente devido à exposição prolongada do parênquima mamário aos efeitos fisiológicos de estrogênio (Pike *et al.* 1981).

2.2.3.2. Gestação e amamentação

Mulheres com nascimento do primeiro filho após os 30 anos de idade apresentam um risco aproximadamente duas vezes maior que as com nascimento

do primeiro filho antes dos 18 anos de idade. Mulheres nulíparas apresentam risco igual às aquelas com nascimento do primeiro filho entre os 25-29 anos de idade (Harris *et al.* 1996; Offit *et al.* 1996).

Longos períodos de lactação reduzem o risco para CM. Uma metanálise evidenciou que a cada gestação e a cada ano de amamentação, o risco relativo para CM diminui em 7% e 4,3%, respectivamente. Além disso, o tempo de amamentação é importante, sendo a redução do risco, proporcional ao aumento do tempo de amamentação (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002*).

2.2.3.3. Hormônios Exógenos

A terapia de reposição hormonal (TRH) está associada a um modesto aumento de risco para CM em mulheres que fizeram uso de TRH por 5 anos ou mais (risco relativo - RR= 1.35), efeito comparável, em magnitude, com o desenvolvimento de CM após a menopausa. A cessação do uso de TRH em 5 anos ou mais, parece não aumentar significativamente o risco para CM (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997*).

Diversos estudos epidemiológicos relacionando o uso de contracepção oral (ACO) com CM resultaram em conclusões similares (Brinton *et al.* 1996; *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997*). O uso freqüente de ACO apresenta um pequeno aumento no RR para CM (RR= 1.24), mas esse risco desaparece após 10 anos de cessação no uso. Mulheres que iniciaram o uso de ACO antes dos 20 anos de idade apresentam um risco ainda maior de desenvolver CM (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997*).

2.2.4. Fatores Ambientais, Hábitos e Costumes de Risco

2.2.4.1. Agrotóxicos

Em uma revisão sistemática de 6 estudos sobre a associação de pesticidas e CM, foi relatada associação positiva, com exceção de um estudo que demonstrou que as mulheres que tiveram contato com pesticidas apresentaram diminuição no risco (Band *et al.* 2000; Bassil *et al.* 2007). Outro estudo envolvendo mulheres que estiveram expostas a pesticidas por 4 ou mais horas diárias por mais de 10 anos, relatou aumento de risco para doenças benignas da mama evidenciadas por exame de mamografia (Dolapsakis *et al.* 2001).

Enquanto a maioria dos estudos relaciona o risco para CM a pesticidas, um estudo observou associação positiva de risco com dois herbicidas usualmente utilizados na agricultura, o triazine e atrazine (Kettles *et al.* 1997).

2.2.4.2. Etilismo

Diversos estudos relataram associação entre o consumo de álcool e o risco para CM. Uma metanálise envolvendo 38 estudos referiu um RR de 1.1 (IC 95%: 1.1-1.2) para uma dose diária de álcool, 1.2 (IC 95%: 1.1-1.3) para duas doses diárias, e 1.4 (IC 95%: 1.2-1.6) para três ou mais doses diárias, em comparação com as etilistas (Longnecker 1994).

Outra metanálise envolvendo 53 estudos (58.515 pacientes com CM) observou aumento de risco em 7.1% (IC 95%: 5.5-8.7) para cada aumento de 10g na ingestão diária de álcool (Hamajima 2002).

2.2.4.3. Tabagismo

Não foi demonstrada associação entre fumantes ativos e risco para CM (*Collaborative Group on Hormonal Factors*, 2002; Terry *et al.* 2002). Diversos estudos relataram um modesto aumento na incidência de CM associado à exposição passiva ao fumo (Hirayma 1984; Jee *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2000; Kropp *et al.* 2002). Adicionalmente, uma metanálise baseada em 11 estudos encontrou um RR de 1.41 (IC 95%: 1.14-1.85) para fumantes passivos (Khuder *et al.* 2000). Outros estudos não encontraram associação (Norlund *et al.* 1997; Wartenberg *et al.* 2000; Nashino *et al.* 2001; Egan *et al.* 2002).

2.2.4.4. Obesidade

Tem sido associada a aumento no risco de CM em mulheres na pós-menopausa (Weitzen *et al.* 2006). Sugere-se que, para cada 5.00 kg de peso adquirido desde o menor peso na vida adulta, o risco de desenvolver CM aumenta em 8.0%. (Trentham-Dietz *et al.* 2000).

A alta ingesta calórica, especialmente de gorduras saturadas, relaciona-se a um aumento de risco para CM, e há a hipótese que modificações na dieta, limitando o consumo diário de gordura para menos de 15-20%, possa diminuir o risco para a doença (Nordevang *et al.* 1992).

Diferentes tipos de gordura como ácidos graxos saturados, insaturados poliinsaturados e *trans*, têm sido relacionados ao CM (Jakovljevic *et al.* 2002). Alguns estudos mostraram que o processo tumorigênico pode ser influenciado pela gordura da dieta e que o ácido linoléico, altamente consumido em países ocidentais, tem sido considerado como um dos indutores da tumorigênese (Rogers *et al.* 1997; Bartsch *et al.* 1999; Jakovljevic *et al.* 2002).

O consumo de micronutrientes e fibras parece ter efeito protetor para o desenvolvimento do CM, bem como a redução da ingestão de carne vermelha, que quando cozida em altas temperaturas contém aminas heterocíclicas que podem atuar como agentes mutagênicos em células do parênquima mamário (De Stefani *et al.* 1997; Willett 2000).

2.2.5. História Pessoal de Câncer de Mama

O risco de desenvolver um tumor secundário de mama para mulheres que já tiveram CM, é 2-6 vezes maior que o risco da população geral para o desenvolvimento de um tumor primário de mama (Chen *et al.* 1999).

2.2.6. História Familiar de Câncer de Mama

Mulheres com familiares de primeiro grau afetadas por CM apresentam, aproximadamente, o dobro do risco de desenvolver a doença, em comparação àquelas sem história familiar. Se houveram dois ou mais familiares afetados, esse risco aumenta ainda mais. Porém, em torno de 85% das mulheres com familiares de primeiro grau com CM não desenvolvem a doença, e mais de 85% das mulheres com CM não possuem história familiar (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2001).

Um pequeno grupo de mulheres apresenta forte história familiar de CM associada a mutações germinativas em genes de alta penetrância. Mutações nos genes *BRCA1* (*Breast Cancer Gene 1*) e *BRCA2* (*Breast Cancer Gene 2*) abrangem a maioria das famílias portadoras (2-5% dos casos da doença). As portadoras de mutações nestes genes apresentam um risco cumulativo vital de 50-85% de desenvolver CM (Ford *et al.* 1998).

A história familiar de outros tipos de tumores, por exemplo, endométrio e ovário, pode aumentar o risco para o desenvolvimento de um segundo tumor primário de mama. Um estudo relatou um RR de 2.13 (IC 95%: 1.04-4.35) para CM em mulheres com familiares de primeiro grau com câncer de endométrio e um RR de 1.69 (IC 95%: 0.42-6.83) para mulheres com história familiar de câncer de ovário (Bernstein *et al.* 1992).

Através de um heredograma detalhado, pode-se identificar a história familiar de câncer do paciente, sendo relevante tanto à linhagem materna quanto paterna. O risco para a doença é mais expressivo quando o evento ocorreu em familiar de primeiro grau e o risco torna-se cumulativo quando dois ou mais familiares tiveram CM (Offit *et al.* 1996). Quando o CM ocorre em idade jovem, e há um ou mais familiares de primeiro grau com a doença em idade precoce, suspeita-se de uma síndrome de câncer de mama hereditário (Harris *et al.* 1996; Offit *et al.* 1996).

2.3. Modelos de Estimativa de Risco para Câncer de Mama

Na tentativa de se quantificar de forma mais clara o risco de uma mulher assintomática desenvolver CM ao longo da vida, foram criados modelos que servem na prática para determinar ações que ofereçam benefícios na prevenção primária e secundária do câncer. Há pelo menos três modelos capazes de prever o risco para o desenvolvimento da doença: Modelo de Gail, Modelo de Claus e Modelo de Tyrer-Cuzick. A Tabela 1 descreve as variáveis utilizadas nesses três modelos.

Tabela 1. Variáveis utilizadas para estimar o risco de desenvolver câncer de mama nos Modelos de Gail, Claus e Tyrer-Cuzick.

Variável	Gail	Claus	Tyrer-Cuzick
Informações pessoais			
Idade	X	X	X
Etnia	X		
IMC			X
História reprodutiva			
Menarca	X		X
Nascimento 1° filho	X		X
Menopausa			X
Doença mamária			
Biópsia de mama	X		X
Hiperplasia atípica	X		X
Carcinoma ductal <i>in situ</i>			X
História familiar de câncer de mama			
1° grau	X	X	X
2° grau		X	X
Idade ao diagnóstico		X	X
Câncer de mama em familiares		X	X
Câncer de ovário			X

Modificada de Lalloo *et al.* 2005

2.3.1. Modelo de Gail

O Modelo de Gail foi desenvolvido para uso clínico a partir do *Breast Cancer Detection and Demonstration Project*, um programa de rastreamento mamográfico desenvolvido na década de 70 (Gail *et al.* 1989). É amplamente conhecido e utilizado para predição do risco atual (em 5 anos) e do risco cumulativo (até os 90 anos de idade) de desenvolver CM (Veronesi *et al.* 2002). Porém, considera somente a história familiar de CM em primeiro grau, negligenciando os demais tipos

de câncer e graus de parentesco. O Modelo não considera a idade ao diagnóstico do CM e ignora a história pessoal de neoplasia lobular (Euhus 2001).

As variáveis utilizadas no cálculo do Modelo de Gail são: idade atual da paciente, idade na menarca e ao nascimento do primeiro filho vivo, número de biópsias, presença de atipias mamárias e diagnóstico de CM (Gail *et al.* 1989).

2.3.2. Modelo de Claus

Este modelo foi desenvolvido com base no estudo *Cancer and Steroid Hormone Study (CASH)*. As tabelas desse modelo são usadas para determinar o risco cumulativo para diversas faixas etárias, de acordo com o número de familiares de primeiro ou segundo grau e a idade desses quando do diagnóstico de CM (Claus *et al.* 1994; Ross *et al.* 1997).

O Modelo de Claus é o que melhor considera a história familiar, porém desconsidera histórias de CM bilateral, CM masculino e câncer de ovário, e negligencia todos outros fatores de risco além da idade da paciente (Euhus 2001).

2.3.3. Modelo de Tyrer-Cuzick

Este modelo foi desenvolvido com base no estudo *International Breast Cancer Intervention Study (IBIS)*, sendo utilizado para estimar a probabilidade de mutação em *BRCA1* e *BRCA2* e o risco vital de CM através da análise da história familiar, assim como fatores de risco hormonais e reprodutivos. A ferramenta utilizada para estimar o risco é o *IBIS Breast Cancer Risk Evaluation Tool, RiskFileCalc version 1.0* (Amir *et al.* 2003; Tyrer *et al.* 2004; Fasching *et al.* 2007).

2.4. Rastreamento do Câncer de Mama

O CM, no Brasil, bem como em outros países em desenvolvimento, tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ser feito, na maioria das vezes, numa fase tardia da doença. Aproximadamente a metade dos casos da doença são diagnosticados nos estágios III e IV (Schwartzmann 2001; Thulerl *et al.* 2005).

Medidas de detecção precoce do CM, como programas de rastreamento mamográfico, acompanhado por acompanhamento genético e nutricional, consistem em instrumentos de modificação da história natural da doença, e assim, de controle da mortalidade, ampliando a sobrevivência das mulheres afetadas (Fletcher *et al.* 1993; Moody-Ayers *et al.* 2000).

Nos países onde a política de rastreamento mamográfico foi adotada, como no Reino Unido, Holanda e Suécia, observou-se uma redução na mortalidade por CM em mais de 20% (Jonsson *et al.* 2000; Blanks *et al.* 2000; Jonsson *et al.* 2001; Fracheboud *et al.* 2001).

Em Porto Alegre, em 2004, foi implementado um Programa de Rastreamento Mamográfico populacional – Coorte Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). O programa atende mulheres cadastradas com idade entre 15-69 anos provenientes de 19 programas de saúde da família (PSFs) de Porto Alegre e oferece exame clínico e mamográfico anual a mulheres na faixa etária de 40-69 anos, acompanhamento genético e nutricional, bem como acompanhamento às mulheres com sintomas de doença mamária (Caleffi *et al.* 2005; Caleffi *et al.* 2007).

Em quatro anos deste estudo foram detectados 48 casos de CM, em um total de 9218 mulheres cadastradas. Isto representa uma prevalência de 400 casos a cada 100.000 mulheres, demonstrando o alto índice da doença nesta população (comunicação pessoal Caleffi *et al.* 2008).

Entre o grupo de mulheres com idade entre 40 e 69 anos sem sintomas de doença mamária, submetidas a rastreamento mamográfico anual, 91% dos casos encontrados estavam em estágio iniciais (estágios 0 e 1). Neste mesmo grupo, foi observado que metade das mulheres nunca havia realizado exame de mamografia, e que aproximadamente 10% haviam realizado o último exame de mamografia há mais de três anos, dado que está de acordo com as estimativas nacionais (Instituto Nacional do Câncer 2008).

No NMPOA utiliza-se o sistema *BIRADS (Breast Image Reporting and Data System)* para avaliação dos exames de mamografia e ecografia. O sistema *BIRADS* foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, no Brasil, a partir de 1998, sendo a utilização deste, mundialmente aceita e difundida. A intenção a criação e do uso do sistema *BIRADS*, descrito abaixo, é a uniformização e a padronização dos laudos de mamografia, sujeitos a confusão e subjetividade na interpretação de resultados quando se utilizam critérios meramente descritivos (*American College of Radiology* 1998).

2.4.1. Classificação Mamográfica

O sistema *BIRADS* está detalhado na íntegra na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação de exame de mamografia pelo Sistema *BIRADS*.

Categoria	Descrição
0	Necessita de exame complementar (ecografia)
1	Exame normal, sem nenhuma alteração
2	Achado benigno, negativo para malignidade
3	Lesão provavelmente benigna, requer controle semestral
4	Lesão provavelmente maligna (4a – com leve suspeita; 4b – com suspeita moderada; 4c – altamente suspeita)
5	Lesão radiologicamente maligna
6	Lesão sabidamente maligna

Modificada de *American College of Radiology*, 1998

2.4.2. Categorias de densidade mamária

Além da classificação da imagem mamográfica quanto às categorias *BIRADS*, a mama também pode ser classificada quanto à densidade do parênquima mamário. A densidade mamária está relacionada às quantidades de tecido adiposo (radiotransparente) e fibroglandular (denso) da mama no exame de mamografia. Os padrões mamográficos descritos nesta classificação estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Categorias de densidade da mama.

Categoria	Descrição	Componente Fibroglandular (%)
A	Mama predominantemente adiposa	<25
B	Mama parcialmente gordurosa	26-50
C	Mama com padrão denso e heterogêneo	51-75
D	Mama muito densa	>75
E	Mama heterogeneamente densa	50-75

Modificada de *American College of Radiology*, 1998

2.5. Genética do Câncer de Mama

Alterações genéticas (mutações) relacionadas ao câncer podem ocorrer tanto em células da linhagem somática quanto em células germinativas. A grande maioria ocorre a nível somático em células específicas do tecido em que se desenvolve a neoplasia. Quando mutações relacionadas ao desenvolvimento de câncer ocorrem na linhagem germinativa (óvulos e espermatozóides) de um indivíduo, elas podem ser transmitidas hereditariamente para os descendentes, sendo a grande maioria dos tumores hereditários causados, predominantemente, por mutações germinativas em genes de alta penetrância. (Newman *et al.* 1988; Miki *et al.* 1994; Monteiro 2000).

Os tumores hereditários da mama correspondem a 5-10% de todos os diagnósticos de CM e geralmente manifestam-se em idade precoce (antes da menopausa) acometendo vários indivíduos em mais de uma geração da família. Exemplos de genes de alta penetrância associados a este fenótipo são os genes *BRCA1* e *BRCA2* (Miki *et al.* 1994; Wooster *et al.* 1994).

No entanto, a maioria dos casos de CM não é explicada por alterações em genes de alta penetrância, mas sim, por alterações mais prevalentes e de menor risco, polimorfismos em genes de baixa penetrância, também chamados genes de suscetibilidade, com participação individual relativamente pequena que interagem entre si e com vários fatores ambientais (Peto *et al.* 1996).

O genoma humano consiste em aproximadamente 30.000-35.000 genes. Mutações patogênicas associadas a doenças mendelianas conhecidas foram identificadas em aproximadamente 1.000 genes e cerca de 2-3 milhões de polimorfismos modificadores de fenótipo já foram descritos (Wild 2007).

O genoma dos indivíduos é 99% idêntico, com apenas 1% do genoma apresentando polimorfismos, que são caracterizados como variações de seqüência

que ocorrem em mais de 1% da população e não estão necessariamente associados com doenças, podendo apresentar papel protetor ou deletério no sentido de interferir na idade ao diagnóstico (mais precoce) ou velocidade de progressão (mais acelerada) da doença (Wild 2007).

Os polimorfismos de base única (*SNPs – single nucleotide polymorphism*) são a classe mais freqüente de polimorfismos que surgem a partir de mudanças em nucleotídeos únicos de uma determinada seqüência de DNA. Os *SNPs* estão uniformemente distribuídos por todo o genoma, característica que os torna excelentes marcadores para gerar mapas genéticos densos (Mir *et al.* 2004).

A maior parte dos *SNPs* identificados em genes humanos não resulta em alterações na seqüência protéica, por estarem localizados em regiões não-traduzidas da molécula de RNAm (pré-RNA) ou devido à degeneração de códons. Apenas uma pequena parcela dos *SNPs* tem a capacidade de alterar a seqüência das proteínas, o que pode levar a modificação da sua atividade biológica, polimorfismos estes, chamados de “*SNPs* não-sinônimos”, os que têm maior potencial de impacto biológico (Mir *et al.* 2004).

Publicações envolvendo polimorfismos têm aumentado nesses últimos vinte anos, passando de 470 artigos publicados em 1976, para aproximadamente 12.000 publicações no *Medline* em 2006. O interesse no estudo de polimorfismos reside no fato de que as variações nas seqüências genômicas estão por trás da susceptibilidade para desenvolver, ou capacidade de evitar, doenças como o CM. Estas diferenças podem indicar o surgimento da doença, a intensidade e que tipo de tratamento será o mais efetivo (Coughlin *et al.* 1999; Wild 2007).

Polimorfismos em diversos genes de baixa penetrância têm sido associados a maior ou menor suscetibilidade ao CM e eles tornam-se particularmente importantes

quando são muito prevalentes em determinada população (Dunning *et al.* 1999; De Jong *et al.* 2002). Esses genes são divididos em diversos grandes grupos: os envolvidos em metabolismo de hormônios esteróides (p. ex: *COMT*, *CYP17*, *CYP19*, *CYP2D6*, *ER* e *PR*), os que codificam enzimas importantes no metabolismo de carcinógenos (*CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *NAT1* e *NAT2*), os relacionados ao ciclo celular (*STK15*, *ATM*) e os alelos comuns em genes como *BRCA1* e *TP53* (Dunning *et al.* 1999; Khanna *et al.* 2004).

Entre os genes de suscetibilidade para CM estão os genes *ER* (gene do receptor de estrogênio), *PR* (gene do receptor de progesterona) e *STK15* (gene da serina-treonina quinase).

Para o presente estudo foram escolhidos os polimorfismos *ERα-351 XbaI A/G* e *ERα-397 PvuII T/C* do gene *ER*, polimorfismo *PROGINS* do gene *PR* e *F31I* do gene *STK15*, por estarem associados a um risco relativo > 1.2 para CM (nível de significância de 5%) ou apresentarem relatos sugerindo proteção em relação ao CM em dois ou mais estudos. Além disso, não existe nenhum estudo nacional sobre o possível risco para CM associado a polimorfismos comuns no gene *ER* e no gene *STK15*. Existe somente um estudo sobre o polimorfismo *PROGINS* do gene *PR* e sua relação com CM em uma pequena amostra de indivíduos brasileiros, enfatizando ainda mais a importância de investigação destas variantes genéticas em nosso meio.

As frequências alélicas dos polimorfismos aqui estudados, em mulheres sem CM, disponíveis na literatura internacional e nacional, estão resumidos na Tabela 4. Observa-se uma grande variabilidade de frequências, tanto alélicas quanto genotípicas, em diferentes populações e, portanto, o conhecimento da distribuição

destes alelos e genótipos em dada população é fundamental para o estudo da associação dos mesmos com determinado fenótipo (Tabelas 5-7).

Tabela 4. Genes de suscetibilidade ao câncer de mama e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem câncer de mama

Gene	Localização Cromossômica	Denominação do gene	Polimorfismo Alelos	Freq. Alélica Média (mín-máx)	Referências
<i>ER</i>	11q22-23	Receptor de estrogênio	<i>ERα-351 XbaI A/G</i>		
			Alelo A	a) 0.70; b) 0.56; c) 0.77; d) 0.59	a) Shin <i>et al.</i> 2003; b) Duijnhoven <i>et al.</i> 2006; c) Jakimiuk <i>et al.</i> 2007; d) Molvarec <i>et al.</i> 2007
			Alelo G	a) 0.30; b) 0.44; c) 0.33; d) 0.41	
			<i>ERα-397 PvuII T/C</i>		
Alelo T	a) 0.56; b) 0.61; c) 0.51; d) 0.64	a) Shin <i>et al.</i> 2003; b) Shen <i>et al.</i> 2005; c) Molvarec <i>et al.</i> 2007; d) Hu <i>et al.</i> 2007			
			Alelo C	a) 0.44; b) 0.39; c) 0.49; d) 0.36	
<i>PR</i>	11q22-23	Receptor de progesterona	<i>PROGINS</i>		
			Alelo A1	a) 0.85; b) 0.74; c) 0.80; d) 0.88	a) Wang-Gohrke <i>et al.</i> 2000 ; b) Fabjani <i>et al.</i> 2002; c) Linhares <i>et al.</i> 2005; d) Gomes <i>et al.</i> 2006
			Alelo A2	a) 0.15; b) 0.26; c) 0.20; d) 0.12	
<i>STK15</i>	20q13.2	Serina-treonina quinase / Aurora quinase A	<i>F31I</i>		
			Alelo A	a) 0.66; b) 0.65; c) 0.21; d) 0.22	a) Dai <i>et al.</i> 2004; b) Sun <i>et al.</i> 2005 ; c) Egan <i>et al.</i> 2004; d) Gu <i>et al.</i> 2007
			Alelo T	a) 0.34; b) 0.35; c) 0.79; d) 0.78	

2.6. Polimorfismos Genéticos associados ao Câncer de Mama: Genes envolvidos no Metabolismo de Esteróides

2.6.1. Gene do Receptor de Estrogênio (ER)

O estrogênio é um hormônio lipofílico que ultrapassa a membrana celular e interage com seus receptores específicos, presentes no núcleo de células-alvo, onde regula a expressão gênica (Chlebowski *et al.* 2002). É um hormônio que influencia no crescimento, diferenciação e funcionamento de muitos tecidos-alvo, incluindo a mama, útero, vagina, ovário e próstata (Clark *et al.* 1988).

Na mama, o receptor de estrogênio (ER) é expresso em células epiteliais mamárias, e cerca de 2/3 dos CM expressam níveis mais altos do receptor que o tecido mamário normal (Harvey *et al.* 1999).

Existem dois tipos majoritários de ER (*Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) - 133430), chamados de ER β e ER α . O gene ER β possui estrutura similar ao ER α , porém é menor que ER α (Diehl 2002; *National Center for Biotechnology Information* 2008). No tecido ósseo e epitélio ovariano, observa-se a expressão da isoforma ER β codificada pelo gene ER β (*ESR2*), localizado no cromossomo 14q23-24.1 e composto por 8 exons abrangendo aproximadamente 40 kb (Drummond *et al.* 1999; Ali *et al.* 2000a; Ali *et al.* 2000b; Frasor *et al.* 2003). O ER β está expresso tanto em tecido normal quanto em maligno e sua função, correlação com prognóstico de CM e resposta a hormonioterapia ainda são obscuras (Palmieri *et al.* 2002).

No tecido epitelial mamário, no endométrio e no estroma ovariano normais, predominam os receptores ER α , codificados pelo gene ER α (*ESR1*), localizado no cromossomo 6q25. ER α é composto por 8 exons abrangendo mais de 140 kb (Greene *et al.* 1986).

A proteína *esr1* tem um peso molecular de 66 kDa e contem 595 aminoácidos (Stirone *et al.* 2003). Tanto a proteína *esr1* quanto à *esr2* agem como fatores de transcrição induzindo o ligando, contendo um domínio de ligação ao DNA, um domínio de dimerização, um domínio de ligação ao hormônio e diversos domínios de ativação da transcrição (Osborne *et al.* 2005).

A expressão do *ER α* tem sido amplamente pesquisada em tumores de mama, por ser um importante mediador da resposta hormonal e por estar envolvido em inúmeras das ações estrogênicas em células-alvo, ao induzir, de modo direto, genes associados com o controle da proliferação e apoptose celular, como ciclina *D1*, *TGF α* , IGF-I, *bcl2*, telomerase, e como o receptor de progesterona (*PR*) (Harvey *et al.* 1999). Estudos de caracterização do gene *ER α* revelaram a existência de diversos sítios polimórficos, associados a maior risco para o desenvolvimento de CM (Andersen *et al.* 1994).

A estrutura do gene *ER α* e as diferentes regiões polimórficas identificadas estão demonstradas na Figura 1.

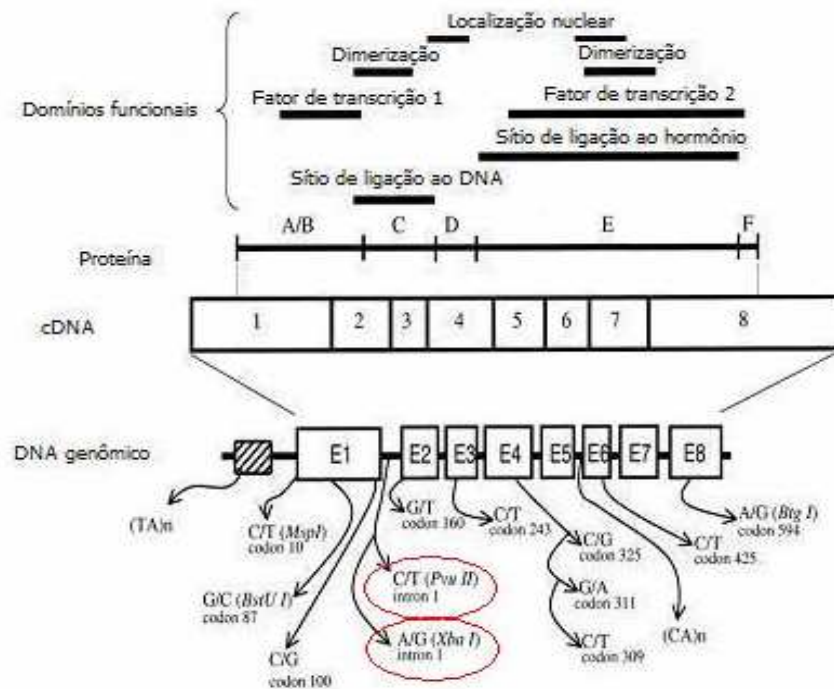


Figura 1. Estrutura, domínios funcionais e polimorfismos descritos do gene *ERα*. Os polimorfismos nos exons E1 a E8 apresentam a localização do códon correspondente. Os polimorfismos intrônicos – *ERα-351 XbaI A/G* e *ERα-397 PvuII C/T* estão indicados. T= timina, C= citosina, G= guanina e A= adenina. TAF= *transcriptional activating function*. (Figura modificada de Gennari *et al.* 2005).

Os polimorfismos mais estudados relacionados ao gene *ERα*, conforme indicado na Figura 1, são dois polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs)*: a) *ERα-397 PvuII C/T* (substituição de citosina por timina no códon 397; rs2234693) e b) *ERα-351 XbaI A/G* (substituição de adenina por guanina no códon 351; rs9340799), ambos localizados no intron 1, separados por 50 pares de bases (Greene *et al.* 1986).

(*) As enzimas de restrição têm seqüências de restrição específicas de reconhecimento do DNA, tendo a propriedade de clivar o DNA em sítios de seqüência específicos, chamados de sítios de restrição. Variações na seqüência do DNA genômico podem criar ou abolir sítios de restrição para enzimas específicas, gerando mediante exposição a estas enzimas, fragmentos polimórficos em comprimento, denominados polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs – *restriction fragment length polymorphism*) (Griffits *et al.* 2000).

A presença dos polimorfismos *ERα-397 PvuII C/T* e *ERα-351 XbaI A/G* (foi relacionada a risco para diversas patologias, como câncer de próstata, osteoporose, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares e CM (Hernandez *et al.* 2006; Monastero *et al.* 2006; Shen *et al.* 2006; Kitamura *et al.* 2007; Kjaergaard *et al.* 2007).

Porém, esses resultados ainda são conflitantes e os mecanismos moleculares pelos quais esses polimorfismos influenciam na atividade do *ERα* ainda não estão completamente claros (Gennari *et al.* 2005).

Na literatura o alelo *C* de *ERα-397 PvuII* é denominado como *P* e alelo *G* de *ERα-351 XbaI* como *X*, ambos em abstenção de sítios de restrição. O alelo *T* de *ERα-397 PvuII* é denominado como *p* e o alelo *A* de *ERα-351 XbaI* como *x*, ambos apresentando sítios de restrição (Gennari *et al.* 2005)

Diversos estudos relataram associação entre os polimorfismos *ERα-397 PvuII C/T* e *ERα-351 XbaI A/G* com CM e/ou com fatores de risco para a doença (Tabela 5-6).

Tabela 5. Estudos de associação do polimorfismo *ERα-397 PvuII C/T* com câncer de mama e/ou com fatores de risco para a doença.

<i>ERα-397 PvuII C/T</i>	<i>TT</i>	↑ risco para câncer de mama	RR: 1.4 (IC 95%: 1.1-1.8)	Cai et al. 2003
	<i>TT</i>	↑ risco para câncer de mama	RR: 1.5 (IC 95%: 0.94-2.42)	Onland-Moret et al. 2005
	<i>TT</i>	Menarca tardia	---	Van Duijnhoven et al. 2005; Jakimiuk et al. 2007
	<i>TT</i>	História familiar positiva de câncer de mama	---	Van Duijnhoven et al. 2005
	<i>TT</i>	Maior número de filhos	---	Van Duijnhoven et al. 2005
	<i>CT</i>	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.14 (IC95%: 1.00-1.32)	Onland-Moret et al. 2005
	<i>CT</i>	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.47 (IC 95%: 0.85-2.54)	Shen et al. 2006
	<i>CT</i>	↑ risco para câncer de mama em mulheres pré-menopáusicas	OR: 2.67 (IC 95%: 1.01-7.05); p=0.048	Hu et al. 2007
	<i>CC</i>	Menopausa precoce	---	Weel et al. 1999
	<i>CC</i>	Expressão ER negativa (pior prognóstico para câncer de mama)	---	Boyapatti et al. 2005
	<i>T</i>	Maior densidade mamográfica		Van Duijnhoven et al. 2005
	<i>T</i>	Maior densidade mamográfica somente em usuárias de TRH	OR: 2.24 (p<0.01)	Van Duijnhoven et al. 2006

Tabela 6. Estudos de associação do polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G* com câncer de mama e/ou com fatores de risco para a doença.

Gene	Genótipo/Alelo	Associação	OR / RR	Referências
<i>ERα-351 XbaI A/G</i>	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.3 (IC 95%: 0.8-2.0)	Andersen <i>et al.</i> 1994
	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 2.38 (IC 95%: 1.58-3.58)	Shin <i>et al.</i> 2003
	AA	↑ risco para câncer de mama em nulíparas	RR: 4.0 (IC 95%: 1.9-8.8)	Shin <i>et al.</i> 2003
	AA	História familiar de câncer de mama	---	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2005
	AA	Menarca tardia	---	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2005; Jakimiuk <i>et al.</i> 2007
	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.23 (IC 95%: 1.0-1.32)	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
	AA	IMC maior	---	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
	AA	↑ não significativo no risco para câncer de mama	OR: 6.88 (IC 95%: 0.80-59.15); p=0.079	Hu <i>et al.</i> 2007
	AG	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.2 (IC 95%: 0.7-1.9)	Andersen <i>et al.</i> 1994
	AG	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.14 (IC 95%: 1.0-1.32)	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
	GG	↓ risco para câncer de mama	OR: 0.82 (IC 95%: 0.68-1.00)	Wang <i>et al.</i> 2007
	A	↑ risco para câncer de mama	---	Andersen <i>et al.</i> 1994; Shin <i>et al.</i> 2003; Onland-Moret <i>et al.</i> 2005 ; Wang <i>et al.</i> 2007
	A	↑ risco para câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas	---	Cai <i>et al.</i> 2003; Shen <i>et al.</i> 2006
	A	Maior densidade mamográfica	---	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2005
	A	História familiar positiva para câncer de mama	---	Shen <i>et al.</i> 2006
	A	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.4 (IC 95%: 1.0-1.9)	Hu <i>et al.</i> 2007
	G	↓ risco para câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas	RR: 0.3 (IC 95%: 0.1-0.5)	Shin <i>et al.</i> 2003

2.6.1.1. Polimorfismo $ER\alpha$ -397 Pvull C/T

O genótipo TT do $ER\alpha$ -397 foi associado a um risco limítrofe para CM, e as associações mostraram-se mais fortes em mulheres com história familiar da doença (Shen *et al.* 2006). Para este mesmo genótipo, Cai *et al.*, relataram um RR para CM de 1.4 (IC 95%: 1.1-1.8) em comparação com o genótipo CC do $ER\alpha$ -397 e, Parl *et al.* observaram uma associação com a ocorrência de CM em idade mais jovem (Parl *et al.* 1989; Cai *et al.* 2003).

O genótipo CT do $ER\alpha$ -397 foi associado a aumento significativo (OR: 2.67, IC 95%: 1.01-7.05) no risco para CM em mulheres pré-menopáusicas (Hu *et al.* 2007).

Mulheres com o genótipo CC do $ER\alpha$ -397 e CM com expressão de ER negativa apresentaram pior prognóstico da doença, em comparação àquelas com CM expressando ER (ER positivo) (Boyapati *et al.* 2005). Porém, em estudo anterior não foi encontrada nenhuma associação dos genótipos de polimorfismo $ER\alpha$ -397 Pvull C/T com CM (Shin *et al.* 2003).

Um estudo recente relatou associação entre o aumento da densidade mamária, importante fator de risco para CM, com a presença dos genótipos CT e TT do $ER\alpha$ -397 (OR: 2.24, $p < 0.01$) em mulheres usuárias de TRH (Van Duijnhoven *et al.* 2006). O mesmo grupo já havia descrito o efeito de polimorfismos em $ER\alpha$ sobre a densidade mamária em imagens mamográficas independente de tratamento hormonal, relatando maior densidade mamográfica em portadoras de uma ou duas cópias do alelo T do $ER\alpha$ -397; associação do genótipo TT do $ER\alpha$ -397 a um maior número de filhos, à menarca tardia, ao uso de anticoncepcional oral e à presença de história familiar de CM (Van Duijnhoven *et al.* 2005).

As frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo *ERα-397 PvuII C/T* previamente descritas em mulheres com e sem CM estão apresentadas nas tabelas 9 e 10 (Anexo 7.1.1).

2.6.1.2. Polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G*

O alelo *A* do *ERα-351* foi associado com maior risco para CM, em diversos estudos (Andersen *et al.* 1994; Shin *et al.* 2003; Onland-Moret *et al.* 2005; Wang *et al.* 2007). No estudo de Shin *et al.* o RR para as mulheres com genótipo *AA* do *ERα-351* de desenvolverem CM foi de 2.38 (IC 95%: 1.58-3.58) comparado àquelas com genótipo *GG* do *ERα-351*, havendo efeito protetor em portadoras de pelo menos uma cópia do alelo *G* (OR: 0.4, IC 95%: 0.3-0.6). Outro achado deste estudo foi que as mulheres nulíparas com genótipo *AA* do *ERα-351* apresentaram um risco maior para a doença quando comparadas às que tiveram a primeira gestação após 30 anos de idade (RR: 4.0, IC 95%: 1.9-8.8) (Shin *et al.* 2003).

Adicionalmente, o alelo *A* do *ERα-351* foi associado a um aumento no risco para CM em mulheres pós-menopáusicas, sendo o OR para os genótipos *AG* e *AA* do *ERα-351* de 1.2 (IC 95%: 0.7-1.9) e 1.3 (IC 95%: 0.8-2.0), respectivamente, quando comparado àquelas com genótipo *GG* do *ERα-351* (Andersen *et al.* 1994). Outros estudos relataram associação deste alelo no risco para CM somente em mulheres pós-menopáusicas (Cai *et al.* 2003; Shen *et al.* 2006). No estudo de Shen *et al.*, foi observado associação entre o alelo *A* do *ERα-351* e história familiar positiva de CM (Shen *et al.* 2006).

Por fim, o alelo *A* do *ERα-351* foi associado a maior densidade mamográfica (Van Duijnhoven *et al.* 2005). Em metanálise sobre este polimorfismo, foi relatado um OR 1.14 (IC 95%: 1.00-1.32) para o genótipo *AG* e 1.23 (IC 95%: 1.00-1.32) para

o genótipo *AA* do *ERα-351* em relação ao genótipo *GG* do *ERα-351* (Van Duijnhoven *et al.* 2006). Outros achados deste estudo foram: IMC ligeiramente maior em mulheres com genótipo *AA* do *ERα-351* e associação negativa entre o uso de TRH e aumento da densidade mamográfica nas mulheres com genótipo *GG* do *ERα-351* (Van Duijnhoven *et al.* 2006).

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *ERα-397 A/G* previamente descritas em mulheres com e sem CM estão apresentadas nas tabelas 11 e 12 (Anexo 7.1.2).

2.6.1.3. Háplótipos de *ERα-397 PvuII C/T* e *ERα-351 XbaI A/G*

De uma maneira geral, os polimorfismos e haplótipos do gene *ERα* têm sido associados a risco para CM, porém os resultados ainda são contraditórios. Num estudo de caso-controle recente foi investigada a associação do risco para CM com genótipos e haplótipos de quatro *SNPs* do *ERα* (rs746432, rs2234693, rs9340799, rs1801132), onde foi observado o efeito protetor do alelo *G* do *SNP ERα-351 XbaI A/G* (rs9340799), OR: 0.82 (IC 95%: 0.68-1.00 e $p=0.04$). Não foram encontradas outras associações estatisticamente significativas entre os haplótipos de *ERα* e CM nas mulheres caucasianas deste estudo (Wang *et al.* 2007).

Outro estudo de haplótipos de *ERα-397 PvuII C/T* - *ERα-351 XbaI* demonstrou que mulheres *px (A-A-T-T)* do *ERα-351 XbaI* têm um maior de desenvolver CM (RR: 1.5; IC 95%: 0.91-2.36), similar ao risco de mulheres com genótipo *TT* do *ERα-397*, independente de *ERα-351 XbaI A/G* (Onland-Moret *et al.* 2005).

A frequência dos haplótipos de *ERα-397 PvuII* - *ERα-351 XbaI* no presente estudo e em estudos internacionais, bem como análise comparativa dos nossos

achados em relação aos achados dos demais estudos, estão apresentadas na tabela 17 (Anexo 7.2).

2.6.2. Gene do Receptor de Progesterona (PR)

O hormônio progesterona é um importante regulador do sistema reprodutivo feminino e encontra-se envolvido na gênese tumoral. É responsável pela maturação dos oócitos e manutenção da gestação, bem como pela maturação da mama e do endométrio. Também é responsável pela supressão da secreção de leite antes do parto (Fabjani *et al.* 2002; Romano *et al.* 2006).

Os efeitos fisiológicos da progesterona são mediados pelo seu receptor (receptor de progesterona – PR), um membro da superfamília dos receptores esteróides derivados do ácido retinóico. O gene para o PR (OMIM 607311) encontra-se localizado no cromossomo 11q22-23 e compreende 8 exons e sete introns (A-G) (Fabjani *et al.* 2002; *National Center for Biotechnology Information* 2008).

A expressão de PR é um importante preditor de intervalos de recidiva do CM e sua presença indica melhor resposta ao tratamento em um CM primário (Clark *et al.* 1988).

As ações da progesterona são mediadas por duas isoformas do receptor: PR-A e PR-B, os quais são fatores de transcrição dependentes de ligante. A isoforma PR-B difere de PR-A pela presença de 164 aminoácidos adicionais na região N-terminal. As demais regiões são idênticas em ambas as proteínas e consistem em um domínio de ligação ao DNA (DBD), um domínio terminal de interação com o ligante (LBD) e uma região tipo “dobradiça” entre DBD e LBD (*h*, “*hinge*”), como demonstrado na Figura 2 (Fabjani *et al.* 2002; Xiaotao *et al.* 2003).

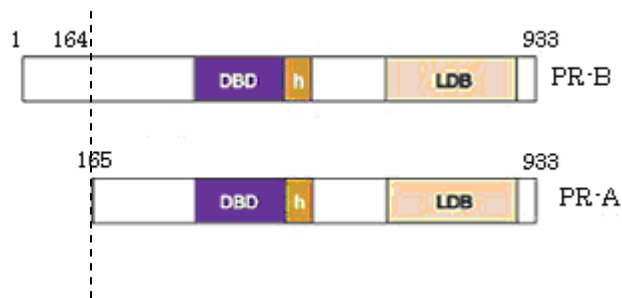


Figura 2. Estrutura das isoformas *PR-A* e *PR-B* do receptor de progesterona (Figura modificada de Xiaotao *et al.* 2003).

As isoformas *PR-A* e *PR-B* são transcritas a partir de um único gene por iniciação alternada da transcrição utilizando dois promotores distintos que mantêm afinidade de interação similares com o DNA e com seus ligantes. Na maioria dos contextos, *PR-B* funciona como um ativador de genes responsivos a progesterona, enquanto *PR-A* permanece transcricionalmente inativo. *PR-A* também funciona com um forte repressor transdominante de *PR-B* e da atividade transcricional de *ER* na presença tanto de agonistas como antagonistas de *PR* (Giangrande *et al.* 2000; Fabjani *et al.* 2002; Xiaotao *et al.* 2003).

A variante genética *PROGINS* do gene *PR* situada na região correspondente ao *LDB* na isoforma *PR-A* pode modificar o risco para diversas doenças benignas como endometriose e leiomioma, e malignas como câncer de ovário e CM (Lancaster *et al.* 1998; Tong *et al.* 2001; Donaldson *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004; Gomes *et al.* 2006).

Alguns estudos relataram associação entre os polimorfismos *PROGINS* com CM e/ou com fatores de risco para a doença (Tabela 7).

Tabela 7. Estudos de associação do polimorfismo *PROGINS* com câncer de mama e/ou fatores de risco para a doença.

Gene	Genótipo/Alelo	Associação	OR / RR	Referências
<i>PR</i>	A2A2	↓ risco para câncer de mama principalmente em mulheres pré-menopáusicas	OR: 0.27 (IC 95%: 0.10-0.74)	Wang-Gohrke <i>et al.</i> 2000
	A2	↑ risco para câncer de mama	---	Garret <i>et al.</i> 1995 Kieback <i>et al.</i> 1998; De Vivo <i>et al.</i> 2003
	A2	↓ risco para câncer de mama	---	Fabjani <i>et al.</i> 2002
	A2	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.3 (IC 95%: 0.9-2.8); p= 0.06	Romano <i>et al.</i> 2005
	A2	Não associado a risco para câncer de mama	---	Manolitsas <i>et al.</i> 1997; Lancaster <i>et al.</i> 1998; Dunning <i>et al.</i> 1999; Lancaster <i>et al.</i> 2003; Pearce <i>et al.</i> 2005
	A2	Não confere risco para câncer de mama	---	Linhares <i>et al.</i> 2005

2.6.2.1. Polimorfismo *PROGINS* do Receptor de Progesterona

A variante polimórfica *PROGINS* (rs1042838) do *PR* consiste de uma inserção *Alu** de 320 bp (320 bp PV/HS-1) no intron G, entre o exon 7 e 8, uma região codificante do domínio de ligação ao ligante, que está associada adicionalmente a duas substituições (*SNPs*): Val660Leu (rs1042838) no exon 4, substituição de guanina por timina causando a troca de uma valina por uma leucina no códon 660, e His770His (rs1042839) no exon 5, substituição de citosina por timina, causando a substituição silenciosa de uma histidina por uma histidina no códon 770 (De Vivo *et al.* 2003; Romano *et al.* 2006), conforme representado esquematicamente na Figura 3. Qualquer uma dessas variantes pode ser considerada um marcador da presença das outras duas, estando todas em perfeito desequilíbrio de ligação (De Vivo *et al.* 2003; Pijnenborg *et al.* 2005; Johnatty *et al.* 2007).

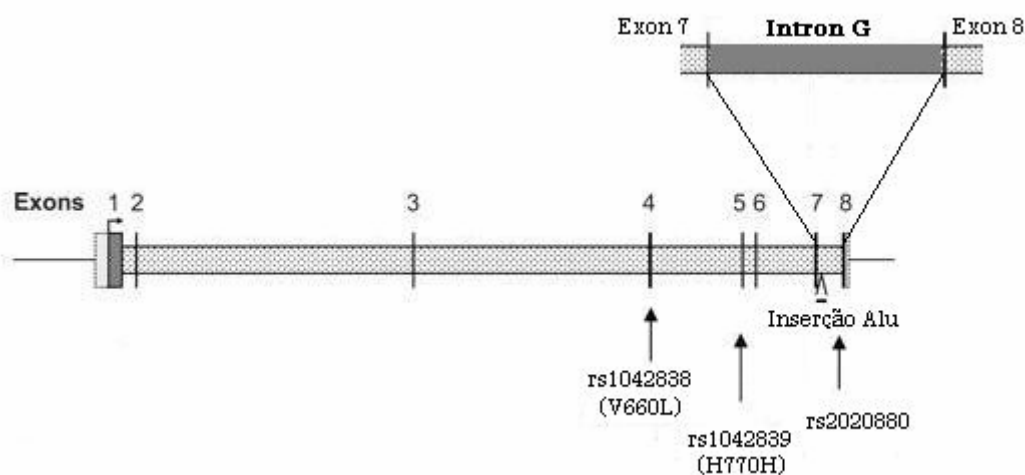


Figura 3. Localização dos polimorfismos de base única V660L, H770H e da inserção *Alu* que caracterizam o complexo polimórfico *PROGINS*.

(*)As seqüências *Alu* constituem seqüências repetidas, espalhadas por todo DNA, existindo aproximadamente 1.200.000 cópias desse elemento, sendo que cada repetição *Alu* possui aproximadamente 300 nucleotídeos em seu comprimento (Donaldson *et al.* 2002). As seqüências *Alu* replicam-se ocasionalmente e a cópia resultante insere-se aleatoriamente em uma nova posição do cromossomo original ou em outro cromossomo, em geral em uma localização que não exerce efeitos sobre o funcionamento dos genes próximos. Cada inserção é um evento único, e uma vez inserida, a seqüência de *Alu* permanece no genoma, sendo transmitida aos seus descendentes (Bamshad *et al.* 2003).

Alterações fenotípicas decorrentes da variante *PROGINS* sugerem que este polimorfismo complexo (inserção *Alu* e dois *SNPs*) seria responsável por alterações na transcrição do gene *PR*, tanto por recombinação quanto por alteração no *splicing* do transcrito primário (Rowe *et al.* 1995).

O polimorfismo *PROGINS* leva a um decréscimo da instabilidade do receptor, acarretando uma diminuição ou perda da capacidade de regulação negativa dos receptores estrogênicos, e conseqüente disfunção no controle desses receptores, expondo excessivamente a glândula mamária à ação estrogênica (Fabjani *et al.* 2002).

O alelo selvagem do gene *PR* é denominado *A1* e o alelo polimórfico *PROGINS*, denominado *A2*. Mulheres com o alelo *A2* apresentam aumento do risco de desenvolver patologias nos tecidos onde a exposição a progesterona tem efeito de proteção como no ovário e endométrio (Modugno 2004; Pijnenborg *et al.* 2005; Romano *et al.* 2006). Na mama, onde a exposição à progesterona não tem efeito protetor, mas sim de estimular a proliferação celular, a variante *PROGINS* teoricamente reduziria o risco para o desenvolvimento do CM (Dunning *et al.* 1999).

Na literatura, a relação do polimorfismo *PROGINS* com CM não está bem clara (Dunning *et al.* 1999). Diversos estudos, citados abaixo, indicam que a presença deste polimorfismo está relacionada a um risco significativo de CM, porém outros estudos relataram relação inversa entre *PROGINS* e o risco de CM.

Um estudo de 1998 em uma população germânica demonstrou que a presença do alelo *PROGINS* (*A2*) estaria relacionada com um risco significativo para CM (Kieback *et al.* 1998), o que foi corroborado em um estudo caso controle em 2003 (De Vivo *et al.* 2003). Garret *et al.*, também evidenciaram significativa associação de

risco para CM em mulheres irlandesas portadoras da variante *PROGINS* (Garret *et al.* 1995).

Outros estudos sobre o polimorfismo *PROGINS* relataram resultados diversos: efeito protetor do alelo *PROGINS* (A2) para CM em mulheres pré-menopáusicas (Wang-Gohrke *et al.* 2000); interação não-significativa entre o polimorfismo e idade da menarca ($p= 0.32$), paridade ($p=0.57$) e duração da amamentação ($p= 0.57$) no risco para a doença (Wang-Gohrke *et al.* 2000).

Não houve associação entre o *SNP His770His* do complexo *PROGINS* com aumento da densidade mamográfica nas usuárias de TRH (Van Duijnhoven *et al.* 2006).

Por fim, associação negativa do *PROGINS* e risco para CM também foi relatada em outros estudos (Manolitsas *et al.* 1997; Lancaster *et al.* 1998; Dunning *et al.* 1999; Lancaster *et al.* 2003; Pearce *et al.* 2005).

Há apenas um estudo nacional sobre o polimorfismo *PROGINS* em que foram analisados 50 casos e 48 controles. Os resultados desse estudo mostraram que o alelo *PROGINS* (A2) não conferiu risco substancial maior para CM em seus portadores (Linhares *et al.* 2005).

O polimorfismo *PROGINS* foi encontrado apenas em humanos, indicando que essa forma variante surgiu em nosso genoma somente após sua divergência de outros primatas. A frequência da variante polimórfica *PROGINS* é bastante diversa em distintos grupos étnicos, sendo maior em gregos (22%) e nula em africanos (0%) (Donaldson *et al.* 2002).

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *PROGINS* previamente descritas em mulheres com e sem CM estão apresentadas nas tabelas 13 e 14 (Anexo 7.1.3).

2.7. Polimorfismos Genéticos associados ao Câncer de Mama: Genes envolvidos com a regulação do Ciclo Celular

2.7.1. Gene da Serina-treonina Quinase (*STK15*)

O gene da serina-treonina quinase (*STK15*) (OMIM 603072) é também conhecido como *AURKA*, *AIK*, *AURA* (*Aurora kinase A*) e *BTAK* (*breast-tumor-amplified kinase*), e está localizado no cromossomo 20q13.2-q13.3.

As auroras quinases (*A*, *B* e *C*) têm papel importante na divisão celular e no controle da segregação das cromátides. O gene *STK15* faz parte da família das auroras quinases *A*. A aurora quinase *A* está localizada nos centrossomos* durante a interfase, sendo translocada para os fusos mitóticos antes da fase mitótica e degradada após a transição da anáfase para metáfase. A ativação da aurora *A* é requerida para a mitose, maturação centrossômica, segregação centrossômica e formação dos cromossomos, e sua inativação é necessária no término da mitose (Marumoto et al. 2005). A Aurora *A* é inativada e degradada quando a célula procede na fase *G1*, ocorrendo sua máxima expressão ocorre na fase *G2/M* (Bolanos-Garcia 2005; Bolanos-Garcia 2005; Fletcher et al. 2006; *National Center for Biotechnology Information* 2008).

A aurora *B* participa na segregação cromossômica e na citocinese, e sua atividade é requerida para a orientação bipolar dos cromossomos e condensação destes. Enquanto que a aurora *C* executa importante papel na espermatogênese e

(*) Os centrossomos mantêm a estabilidade genômica mediante a formação de um fuso bipolar durante a divisão celular permitindo a correta segregação dos cromossomos durante a mitose. Defeitos no número de centrossomos, na organização e no comportamento dos mesmos, definido como amplificação centrossômica, são importantes características do CM e outros tumores sólidos em geral. Defeitos nos centrossomos têm sido associados à transformação neoplásica pelo aumento na incidência de mitoses múltiplas e anormalidades no fuso mitótico e aneuploidia, este último considerado com um dos primeiros eventos na formação tumoral (Nigg 2002).

na interação com a aurora *B* na regulação da segregação cromossômica e citocinese (Dewar *et al.* 2004). A aurora *C* executa papel importante na espermatogênese e interage com a aurora *B*, ao atuar na regulação da segregação cromossômica e citocinese (Bolanos-Garcia 2005).

Estruturalmente, as auroras quinases *A*, *B* e *C* são quinases de 309-403 aminoácidos, e apresentam domínios funcionais similares: um domínio *N*-terminal de 39-129 resíduos de comprimento, um domínio da proteína quinase e um domínio *C*-terminal de 15-20 resíduos (Brown *et al.* 2004).

A hiperexpressão de *STK15* leva à amplificação centrossômica, instabilidade cromossômica e aneuploidia, e já foi detectada em uma variedade de tumores: CM, câncer de próstata, câncer de ovário e câncer colorretal (Lengauer *et al.* 1998).

Estudos internacionais têm relatado associação do *SNP STK15 F31I* e CM (Tabela 8).

Tabela 8. Alguns estudos de associação do polimorfismo do gene *STK15 F31I* com câncer de mama e/ou fatores de risco para a doença.

Gene	Genótipo/Alelo	Associação	OR / RR	Referências
<i>F31I</i>	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.54 (IC 95%: 0.96-2.47)	Egan <i>et al.</i> 2004
	AA	IMC≥25 em mulheres pós-menopáusicas	OR: 4.1 (IC 95%: 1.7-9.8)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.2 (IC 95%: 0.9-1.6)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AA	Índice cintura quadril ≥0.835 em mulheres pós-menopáusicas	OR: 2.4 (IC 95%: 1.0-5.7)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AA	≥29 anos de menstruação em mulheres pós-menopáusicas	OR: 2.9 (IC 95%: 1.3-6.1)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.66 (IC 95%: 1.29-2.12)	Sun <i>et al.</i> 2004
	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.35 (IC 95%: 1.12-1.64)	Ewart-Toland <i>et al.</i> 2005
	AA	Não associado a desenvolvimento de câncer de mama primário	OR: 0.79 (IC 95%: 0.58-1.06)	Fletcher <i>et al.</i> 2006
	AA	↑ risco para câncer de mama em mulheres mais acentuado em pós-menopáusicas com IMC < 25	OR: 1.90 (IC 95%: 1.11-3.25)	Cox <i>et al.</i> 2006
	AA	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.40 (IC 95%: 0.97-2.02)	Cox <i>et al.</i> 2006
	AA	↑ risco para câncer de mama em pós-menopáusicas	OR: 1.57 (IC 95%: 1.05-2.33)	Cox <i>et al.</i> 2006
	AT	IMC≥25 em mulheres pós-menopáusicas	OR: 3.3 (IC 95%: 1.4–7.7)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AT	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.3 (IC 95%: 1.0-1.7)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AT	Índice cintura quadril ≥0.835 em mulheres pós-menopáusicas	OR: 2.4 (IC 95%: 1.0-5.8)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AT	≥ 29 anos de ciclos ovulatórios ininterruptos em mulheres pós-menopáusicas	OR: 2.9 (IC 95%: 1.3-6.1)	Dai <i>et al.</i> 2004
	AT	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.10 (IC 95%: 0.97-1.25)	Ewart-Toland <i>et al.</i> 2005

2.7.1.1. Polimorfismo *STK15 F31I*

A substituição de timina por adenina no códon 91 do gene *STK15* causa a substituição do aminoácido fenilalanina (*F*) por isoleucina (*I*), o que tem uma consequência fenotípica na proteína (Fletcher *et al.* 2006).

Ainda não existem estudos nacionais envolvendo polimorfismos ou mutações no gene *STK15*, nem estudos que descrevam as frequências gênicas e genotípicas de polimorfismos neste gene e/ou associação com risco para CM.

Um estudo em mulheres chinesas de Shangai (1.102 casos de CM e 1.186 controles) encontrou associação positiva entre sobrepeso (IMC \geq 25) em mulheres pós-menopáusicas e o alelo *A* do *STK15 F31I*, sendo os OR de 3.3 (IC 95%: 1.4–7.7) e 4.1 (IC 95%: 1.7-9.8) para os genótipos *AT* e *AA STK15 F31I*, respectivamente. Em heterozigotas *AT* do *STK15 F31I*, foi relatado aumento de risco para CM (OR: 1.3, IC 95%: 1.0-1.7), bem como o homozigotas *AA* do *STK15 F31I*, (OR: 1.2, IC 95%: 0.9-1.6) (Dai *et al.* 2004). Nesse mesmo estudo os autores apontaram que o risco para CM associado a este polimorfismo é modificado por sobrepeso, alto índice cintura-quadril, longa duração de amamentação e muitos ciclos menstruais antes do primeiro filho (Dai *et al.* 2004).

Outro estudo caso-controle sobre polimorfismos no gene *STK15* e CM envolvendo mulheres de Wisconsin, New Hampshire e Massachusetts (EUA) observou aumento do risco em indivíduos homozigotos para o alelo *A* do *STK15 F31I*, (OR: 1.54, IC 95%: 0.96-2.47). A presença do alelo *A* de *STK15 F31I* e de outro polimorfismo no mesmo gene, *STK15 V57I*, alelo *G*, foi associada a um aumento de 2 vezes no risco (OR: 1.96, IC 95%: 1.01-3.79) para CM invasivo na pós-menopausa (IC 95%: 1.01-3.79) (Egan *et al.* 2005).

Sun *et al.* relataram aumento do risco para CM, principalmente em mulheres jovens, associado ao genótipo AA do *STK15 F31I* (OR: 1.66, IC 95%: 1.29-2.12), sendo o risco mais elevado em mulheres jovens, e referiram que este genótipo está associado a um aumento do risco de ocorrência de CM, mas não de progressão da doença (Sun *et al.* 2004).

Em estudo recente sobre o polimorfismo *STK15 F31I*, também foi observado: aumento do risco para CM associado ao genótipo AA de *STK15 F31I* (OR: 1.40, IC 95%: 0.97-2.02); aumento do risco para CM em pós-menopáusicas homozigotas AA do *STK15 F31I* (OR: 1.57, IC 95%: 1.05-2.33), aumento no risco em mulheres com genótipo AA do *STK15 F31I* e genótipo GG do *STK15 G91A* (V57I) (OR 1.63, IC 95%: 1.08-2.45) Por fim, observaram um aumento do risco para CM invasivo em mulheres pós-menopáusicas com IMC < 25 e homozigotas AA (OR: 1.90, IC 95%: 1.11-3.25), este último achado contradizendo o estudo de Dai *et al.* (Dai *et al.* 2004; Cox *et al.* 2006).

Enquanto que Ewart-Toland *et al.* realizaram uma metanálise de 4 estudos envolvendo CM e o polimorfismo *STK15 F31I*, e observaram que os genótipos AA e AT do *STK15 F31I*, são os o que apresentam maior risco para a doença, respectivamente (OR: 1.35, IC 95%: 1.12-1.64) e (OR: 1.10, IC 95%: 0.97-1.25) (Ewart-Toland *et al.* 2005). Porém, no estudo de Fletcher *et al.*, o genótipo AA do *STK15 F31I* não foi associado a desenvolvimento de CM primário (OR: 0.79, IC 95%: 0.58-1.06) (Fletcher *et al.* 2006).

No estudo de Lo *et al.*, a frequência do polimorfismo *STK15 F31I* não diferiu entre casos e controles, mas um haplótipo específico contendo o alelo A do

STK15 F31I foi encontrado com mais frequência em casos do que em controles (Lo *et al.* 2005).

As frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *STK15 F31I* previamente descritas em mulheres com e sem CM estão apresentadas nas tabelas 15 e 16 (Anexo 7.1.4).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1. Justificativa

O CM é um problema significativo de saúde pública, devido às suas altas taxas de incidência no Brasil e especialmente no Rio Grande do Sul e Porto Alegre, devido à sua morbi-mortalidade e elevados custos de tratamento. Dessa forma, o conhecimento acerca de alterações em genes de suscetibilidade relacionados a risco e proteção para o desenvolvimento da patologia é relevante para determinar fatores etiológicos e direcionar adequadamente estratégias de prevenção.

A correlação de polimorfismos de baixa penetrância associados ao CM com outros fatores de risco não-genéticos (ambientais, hormonais) poderá auxiliar no entendimento do perfil epidemiológico e mecanismos de carcinogênese da mama em nosso meio.

3.2. Objetivos

3.2.1. Geral

Caracterizar uma amostra de 750 mulheres com idade entre 40-69 anos quanto à presença e frequência dos polimorfismos *ERα-351 XbaI A/G* e *ERα-397 PvuII C/T* do gene receptor de estrogênio (*ER*), *PROGINS* do gene receptor de progesterona (*PR*) e *STK15 F31I* do gene da serina-treonina quinase (*STK15*), correlacionando os achados moleculares com fatores de risco para CM nesta amostra.

3.2.2. Específicos

3.2.2.1 Caracterizar a população estudada quanto a fatores de risco não-genéticos para o CM, estimativa do risco de desenvolver CM ao longo da vida e quanto ao resultado de exame de mamografia.

3.2.2.2 Comparar as frequências gênicas e genótípicas dos polimorfismos obtidas no estudo com aquelas já descritas na literatura.

3.2.2.3 Verificar se existe associação entre os diferentes alelos e/ou genótipos dos polimorfismos *ERα-351 XbaI A/G* e *ERα-397 PvuII C/T*, *PROGINS* e *STK15 F31I* com outros fatores de risco previamente descritos na literatura: idade na menarca, idade ao nascimento do primeiro filho vivo, idade na menopausa, nuliparidade, índice de massa corporal, terapia de reposição hormonal e densidade mamária.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albagha OM, Mc Guigan FE, Reid DM, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: Haplotype analysis in women from the United Kingdom. *Journal of Bone Mineral Research*. 2001; 16:128-134.

Ali SH, Coombes RC. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2000; 5(3):271-281.

Ali SH, O'Donnell AL, Balu D, et al. Estrogen receptor-alpha in the inhibition of cancer growth and angiogenesis. *Cancer Research*. 2000; 15;60(24):7094-7098.

American Cancer Society. <http://www.cancer.org>. Acessado em Dezembro de 2007.

American College of Radiology. Illustrated breast imaging reporting and data system (BIRADS). Reston: American College of Radiology, 3ª edição, 1998.

Amir E, Evans DG, Shenton A, et al. Evaluation of breast cancer risk assessment packages in the family evaluation and screening programme. *Journal of Medical Genetics*. 2003; 40(11):807-814.

Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, et al. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Human Genetics*. 1994; 94(6):665-670.

Anton-Culver H, Cohen PF, Gildea ME, et al. Characteristics of BRCA1 mutations in a population-based case series of breast and ovarian cancer. *European Journal of Cancer*. 2000; 36(10):1200-1208.

Bagger YZ, Jorgensen HL, Heegaard AM, et al. No major effects of estrogen receptor gene polymorphisms on bone mineral density or bone loss in post-menopausal Danish women. *Bone*. 2000; 26:111-116.

Bamshad MJ, Wooding S, Watkins, et al. Human population genetic structure and indifference of group membership. *American Journal of Human Genetics*. 2003; 72(3):578-589.

Band PR, Le ND, Fang R, et al. Identification of occupational cancer risks in British Columbia. A population-based case control study of 995 incident breast cancer cases by menopausal status, controlling for confounding factors. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2000; 42:284-310.

Bartsch H, Nair J, Owen, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 1999; 20(12):2209-2218.

Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, *et al.* Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Canadian Family Physician*. 2007; 53(10):1704-1711.

Becherini L, Gennari L, Masi L, *et al.* Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet*. 2000; 9:2043-2050.

Bernstein JL, Thompson WD, Risch N, *et al.* The genetic epidemiology of second primary breast cancer. *American Journal of Epidemiology*. 1992; 136:937–948

Blanks RG, Moss SM, McGahan CE, *et al.* Effect of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in England and Wales, 1990-8: comparison of observed with predicted mortality. *British Medical Journal*. 2000; 321(7262):665-669.

Bolanos-Garcia VM. Aurora Kinases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2005; 37(8):1572-1577.

Boyapati SM, Shu X, Ruan ZX, *et al.* Polymorphisms in RE α Gene Interact with Estrogen Receptor Status in Breast Cancer Survival. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11:1093-1098.

Brinton LA. Hormones and risk of cancers of the breast and ovary. *Cancer Causes and Control*. 1996; 7(6):569-571.

Brito MRV, Cunha J, Vieira PC, *et al.* Perfil Epidemiológico de Mortalidade por Neoplasias. Porto Alegre 1996-2006. *Sistema de Informações por Mortalidade, Prefeitura de Porto Alegre*, 2008.

Brown JR, Koretke KK, Birkeland ML, *et al.* Evolutionary relationships of Aurora Kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evolutionary Biology*. 2004; 12;4(1):39.

Cai Q, Shu XO, Jin F, *et al.* Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2003; 12(9):853-859.

Caleffi M, Ashton-Prolla P, Weber B, *et al.* Breast cancer screening in 10.000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort. 2005. 23;16:1020. *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2005; 23(16S) :1020.

Caleffi M, Bedin AJ, Zignani JM, *et al.* Prevalence of breast cancer risk factors in two different cohorts in relation to health care access and preventive programs in southern Brazil. *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2007; 25(18S):1538.

Carvalho CV, D' Amora P, Sato H, *et al.* Polimorfismo do Gene do Receptor de Progesterona (*PROGINS*) em Mulheres com Endometriose Pélvica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2004; 26(8):613-617.

Chen Y, Thompson W, Semenciw R, *et al.* Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prevention*. 1999; 8;10:855-861.

Chlebowski RT, Col N, Winer EP, *et al.* American Society of Clinical Oncology technology assessment of pharmacologic interventions for breast cancer risk reduction including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition. *Journal of Clinical Oncology*. 2002; 20(15):3328-3343.

Chu KC, Tarone RE, Kessler LG, *et al.* Recent trends in U.S. breast cancer incidence, survival, and mortality rates. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996; 88:1571-1579.

Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Seminars in oncology*. 1988; 15(2S):20-25.

Claus EB, Risch N, Thompson D, *et al.* Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer*. 1994; 73:643-651.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*. 1997; 350;9084:1047-1059.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358;9291:1389-1399.

Collaborative Group on Hormonal Factors. Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British Journal of Cancer*. 2002; 87:1234–1245.

Coughlin SS, Piper M. Genetic Polymorphisms and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1999; 8:1023-1032.

Cox DX, Hankinson SE, Hunter DJ. Polymorphisms of the *AURKA* (*STK15/Aurora Kinase*) Gene and Breast Cancer Risk (United States). *Cancer Causes and Control*. 2006; 14(1):81-83.

Dai Q, Cai Q, Shu X, *et al.* Synergistic Effects of STK15 Gene Polymorphisms and Endogenous Estrogen Exposure in the Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2004; 13:2065-2070.

De Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, *et al.* Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *Journal of Medical Genetics*. 2002; 39:225-242 .

De Stefani E, Ronco A, Mendilabarsu M, *et al.* Meat intake, heterocyclic amines, and risk of breast cancer: a case control study in Uruguay. *Cancer Epidemiology and Biomarkers Prevention*. 1997; 6(8):573-81.

De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, *et al.* A Functional Polymorphism in the Progesterone Receptor Gene is Associated with an Increase in Breast Cancer Risk. *Cancer Research*. 2003; 63:5236-5238.

Dewar H, Tanaka K, Nasmyth K, *et al.* Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature*. 2004; 4;428(6978):93-97.

Diehl P. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicology Letters*. 2002; 127;(1-3):217-224.

Dolapsakis G, Vlachonikolis IG, Varveris C, *et al.* Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete. *European Journal of Cancer*. 2001; 37:1531-1536.

Donaldson CJ, Crapanzano JP, Watson JC, *et al.* *PROGINS* *Alu* insertion and human genomic diversity. *Mutation Research*. 2002; 501(1-2):137-141.

Drummond AE, Baillie AJ, Findlay JK. Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1999; 25;149(1-2):153-161.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, *et al.* A Systematic Review of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1999; 8:843-854.

Egan KM, Newcomb PA, Longnecker MP, *et al.* Jewish religion and risk of breast cancer. *Lancet*. 1996; 15;347(9016):1645-1646.

Egan DM, Stampfer MJ, Hunter D, *et al.* Active and passive smoking in breast cancer: prospective results from the nurses' health study. *Epidemiology*. 2002; 13:138-145.

Egan KM, Newcomb PA, Ambrosone CB, *et al.* *STK15* polymorphism and breast cancer risk in a population-based study. *Carcinogenesis*. 2004; 25(11):2149-53. Errata: *Carcinogenesis*. 2005; 26(3):701.

Euhus DM. Understanding mathematical models for breast cancer risk assessment in routine clinical use. *Breast Journal*. 2001; 7(4):224-232

Ewart-Toland A, Dai Q, Gao YT. Aurora-A/*STK15* T+91A is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types. *Carcinogenesis*. 2005; 26(8):1368-1373.

Fabjani G, Tong D, Czerwenka K, *et al.* Human Progesterone receptor gene polymorphism *PROGINS* and risk for breast cancer in Austrian women. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2002; 72(2):131-137.

Fasching PA, Bani MR, Nestle-Kramling C, *et al.* Evaluation of mathematical models for breast cancer risk assessment in routine clinical use. *European Journal of Cancer Prevention*. 2007; 3:216-224.

Fidler IJ. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. *Cancer: principles & practice of oncology*. 1997; 67:135-152.

Fletcher SW, Black W, Harris R, *et al.* Report of the International Workshop on Screening for Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993; 85(20):1644-1656.

Fletcher O, Johnson N, Palles C, *et al.* Inconsistent association between the *STK15* F31I Genetic Polymorphism and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006; 19; 98(14):1014-1018.

Ford D, Easton DF, Stratton M, *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of Human Genetics*. 1998; 62;3:676-689.

Fracheboud J, de Koning HJ, Boer R, *et al.* Nationwide breast cancer screening programme fully implemented in The Netherlands. *Breast*. 2001; 10(1):6-11.

Frasor J, Barnett DH, Danes JM, *et al.* Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*. 2003; 144(10):4562-4574.

Gail MH, Brinton LA, Byar DP, *et al.* Projecting Individualized Probabilities of Developing Breast Cancer for White Females Who Are Being Examined Annually. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989; 81(24):1879-1886.

Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, *et al.* Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998; 81:1879-1886.

Garret E, Rowe SM, Coughlan SJ, *et al.* Mendelian inheritance of a TaqI restriction fragment length polymorphism due to an insertion in the human progesterone

receptor gene and its allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Research, Therapy and Control*. 1995; 4:217-222.

Gennari L, Merlotti D, De Paola V, *et al*. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis : A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*. 2005; 161:307-320.

Ghafoor A, Jemal A, Ward E, *et al*. Trends in breast cancer by race and ethnicity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2003; 53(6):342-355. Errata: *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004; 54(3):181.

Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, *et al*. The opposing transcriptional activities of the isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Molecular and Cellular Biology*. 2000; 20(9):3102-3115.

Gomes MTV, Castro RA, Villanova FE, *et al*. Relação entre polimorfismo do gene do receptor de progesterona, raça, paridade e ocorrência de leiomioma uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2006; 28(5):278-284.

Gonçalves ATC, Jobim PFC, Vanacor R, *et al*. Câncer de Mama – Mortalidade Crescente nos Três Estados da Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, *et al*. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986; 231:1150-1154.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, *et al*. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7ª edição, New York, 2000.

Gu J, Gong Y, Huang M, *et al*. Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. *Carcinogenesis*. 2007; 28(2):350-355.

Hallal C, Gotlieb SLD, Latorre MRDO. Evolução da mortalidade por neoplasias malignas no Rio Grande do Sul, 1979-1995. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2001; 4:169-177.

Han K, Choi J, Moon I, *et al*. Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turnover in Korean pre-, peri- and postmenopausal women. *Osteoporosis International*. 1999; 9 :290-295.

Harris J, Lippman ME, Morrow M, *et al*. Diseases of the Breast. *Lippincott-Raven*. p. 162, 1996.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, *et al*. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1999; 17(5):1474-1781.

Hamajima N, Hirose K, Tajima K, *et al.* Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. *British Journal of Cancer* 2002; 87:1234–1245.

Henderson BE, Ross RK, Judd HL, *et al.* Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*. 1985; 1;56(5):1206-1208.

Hernandez J, Balic I, Johnson-Pais TL, *et al.* Association between an estrogen receptor alpha gene polymorphism and the risk of prostate cancer in black men. *Journal of Urology*. 2006; 175(2):523-527.

Hirayma T. Cancer mortality in nonsmoking women with smoking husbands on a large-scale cohort study in Japan. *Preventive Medicine*. 1984; 13:680–690.

Hsieh YY, Wang YK, Chang CC. Estrogen receptor alpha -351 *Xba*I*G and -397 *Pvu*II*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma. *Molecular Human Reproduction*. 2007; 13(2):117-122.

Hu W, Kavanagh JJ, Deaver M, *et al.* Frequent overexpression of *STK15/Aurora-A/BTAK* and chromosomal instability in tumorigenic cell cultures derived from human ovarian cancer. *Oncology Research*. 2005; 15(1):49-57.

Hu Z, Song CG, Lu JS, *et al.* A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER Alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/BRCA2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133(12):969-978.

Instituto Nacional do Câncer (INCa). [http:// www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acessado em Abril de 2007.

Instituto Nacional do Câncer (INCa). <http://www.inca.gov.br>. Acessado em Fevereiro de 2008.

Jakimiuk AJ, Nowicka M, Bogusiewicz M, *et al.* Prevalence of estrogen receptor α *Pvu*II and *Xba*I polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 2007; 45(4):331-338.

Jakovljevic J, Touiland MS, Bondy ML, *et al.* Dietary intake of selected fatty acids cholesterol and carotenoids and estrogen receptor status in premenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2002; 75(1):5-14.

Jee SH, Ohrr H, Kim IS. Effects of husbands' smoking on the incidence of lung cancer in Korean women. *International Journal of Cancer*. 1999; 28:824–828.

Johnatty SE, Spurdle AB, Beesley J, *et al.* Progesterone receptor polymorphisms and risk of breast cancer: results from two Australian breast cancer studies. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007; 109(1):91-99.

Johnson KC, Hu J, Mao Y. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada: 1994–97. *Cancer Causes Control*. 2000; 11:211–221.

Jonsson H, Tornberg S, Nystrom L, *et al.* Service screening with mammography in Sweden--evaluation of effects of screening on breast cancer mortality in age group 40-49 years. *Acta Oncology*. 2000; 39(5):617-623.

Jonsson H, Nystrom L, Tornberg S, *et al.* Service screening with mammography of women aged 50-69 years in Sweden: effects on mortality from breast cancer. *Journal of Medical Screening*. 2001; 8(3):152-160.

Kettles MK, Browning SR, Prince TS, *et al.* Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties. *Environmental Health Perspectives*. 1997; 105:1222-1227.

Khanna KK, Chenevix-Trench G. ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2004; 9(3):247-262.

Khuder SA, Simon VJ Jr. Is there an association between passive smoking and breast cancer? *European Journal of Epidemiology*. 2000; 16(12):1117-1121.

Kieback DG, Tong X, Weigel NL, *et al.* A genetic mutation in progesterone receptor (*PROGINS*) leads to an increased risk of non-familial breast and ovarian cancer causing inadequate control of estrogen receptor driven proliferation. *Journal of the Society Gynecologic Investigation*. 1998; 5(1):40A.

Kitamura I, Ando F, Koda M, *et al.* Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor alpha gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese. *Bone*. 2007; 40(6):1623-1629.

Kjaergaard AD, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, *et al.* Estrogen receptor alpha polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture: cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis. *Circulation*. 2007; 115(7):861-871.

Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, *et al.* Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *Journal of Bone Mineral Research*. 1996. 11:306-311.

Kropp S, Chang-Claude J. Active and passive smoking and risk of breast cancer by age 50 years among German women. *American Journal of Epidemiology*. 2002; 156:616–626.

Laloo F, Kerr B, Friedman J, *et al.* Risk assessment and management in cancer genetics. *Oxford University Press*. 2005.

Lancaster JM, Berhuck A, Carney ME, *et al.* Progesterone receptor gene polymorphism a risk for breast and ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 1998; 78:227.

Lancaster JM, Wenham RM, Halabi S, *et al.* No relationship between ovarian cancer risk and progesterone receptor gene polymorphism in a population-based, case-control study in North Carolina. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003; 12(3):226-227.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998; 396(6712):643-649.

Linhares JJ, Silva IDCG, Souza, NCN, *et al.* Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (*PROGINS*) em mulheres com câncer de mama: estudo caso-controle. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2005; 27(8):473-478.

Longnecker MP. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control*. 1994; 5:73–82.

Lo YL, Yu JC, Chen ST, *et al.* Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the mitosis-regulating gene *Aurora-A/STK15/BTAK*. *International Journal of Cancer*. 2005; 115(2):276-283.

Manolitsas TP, Englefield P, Eccles DM, *et al.* No association of a 306-bp insertion polymorphism in the progesterone gene with ovarian and breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1997; 75(9):1398-1399.

Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A – a guardian of poles. *Nature Reviews: Cancer*. 2005; 5(1):42-50.

Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Câncer no Brasil: Dados dos Registros de Base Populacional*. Rio de Janeiro. p.125, 2003.

Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 2004; 159(4):319-335.

Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M, *et al.* Estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 382(1-2):100-105.

Monastero R, Cefalu AB, Camarda C, *et al.* Association of estrogen receptor alpha gene with Alzheimer's disease: a case-control study. *Journal of Alzheimers Diseases*. 2006; 9(3):273-278.

Monteiro AN. BRCA1: exploring the links to transcription. *Trends Biochemical Science*. 2000; 25:469-474.

Moody-Ayers SY, Wells CK, Feinstein AR. "Benign" tumors and "early detection" in mammography-screened patients of a natural cohort with breast cancer. *Archives of Internal Medicine*. 2000; 16(8):1109-1115.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, *et al.* A Strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; 266:66-71.

Mir L. *Genômica*. Editora Atheneu, 2004.

Nashino Y, Tsubono Y, Tsuji I, *et al.* Passive smoking at home and cancer risk: a population-based prospective study in Japanese nonsmoking women. *Cancer Causes Control*. 2001; 12:797-802.

National Center for Biotechnology Information (NCBI)- Online Mendelian Inheritance in Man . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em Março de 2008.

Newman B, Austin MA, Lee M. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high risk families. *Proceedings of the National Academic Science USA*. 1988; 85:3044-3048.

Nigg EA. Centrossome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature reviews: Cancer*. 2002; 2(11):815-825.

Nordevang E, Callmer E, Marmur A, *et al.* Dietary intervention in breast cancer patients: effects on food choice. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1992; 46(6):387-396.

Norlund LA, Carstensen JM., Pershagen G. Cancer incidence in female smokers: a 26-year follow-up. *International Journal of Cancer Research*. 1997; 73:625-628.

Observatório da cidade de Porto Alegre. <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/observatorio>. Acessado em Maio de 2007.

Offit K, Gilewski T, McGuire P, *et al.* Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *Lancet*. 1996; 347:1643-1645.

Onland-Moret NC, Van Gils CH, Roest M, *et al.* The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes and Control*. 2005; 16(10):1195-1202.

Organização Mundial da Saúde 2007. <http://www.oms.com>. Acessado em Março de 2008.

Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23(8):1616-1622.

Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, *et al.* Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2002. 9(1):1-13.

Parl FF, Cavener DR, Dupont WD. Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1989; 14(1):57-64.

Patel MS, Cole DE, Smith JD, *et al.* Alleles of estrogen receptor α gene na estrogen cotranscriptional activator gene, amplified in breast cancer-1 (AIB1), are associated with quantitative calcaneal ultrasound. *Journal of Bone Mineral Research*. 2000; 15:2231-2239.

Pearce CL, Hirschhorn JN, Wu AH, *et al.* Clarifying the PROGINS allele association in ovarian and breast cancer risk: a haplotype-based analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005; 97(1):51-59.

Peto J, Easton DF, Matthews FE, *et al.* Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS study. *International Journal of Cancer*. 1996; 65:273-283.

Pijnenborg JM, Romano A, Dam-de Veen GC, *et al.* Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma. *Journal of Pathology*. 2005; 205(5):597-605.

Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, *et al.* Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *British Journal of Cancer*. 1981; 43:72-76.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, *et al.* *SEER cancer statistics review, 1973-1999, Bethesda (MD): National Cancer Institute*. 2002.

Rogers AE. Diet and breast cancer: studies in laboratory animals. *Journal of Nutrition*. 1997; 127(5):933s-935s.

Romano A, Lindsey PJ, Fisher DC, *et al.* Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2006; 101(2):287-295.

Romano A, Delvoux B, Fisher DC, *et al.* The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2007; 38:331-350

Ross JA, Severson RK, Davis S, *et al.* *Breast Cancer Research and Treatment*. 1997; 42(2):187-192

Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ, *et al.* Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an *Alu* sequence insertion. *Cancer Research*. 1995; 55:2743-2745.

Schwartzmann G. Breast cancer in South America: challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 9(18 Suppl):118S-124S.

Shen Y, Li D, Wu J, *et al*. Joint effects of the CYP1A1 MspI, ER α PvuII, and ER α PvuII polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2006; 15(2):342-347.

Shin A, Kang D, Nishio H, *et al*. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2003; 80(1):127-131.

Stirone C, Duckles SP, Krause DN. Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2003; 284(1):E184-192.

Sun T, Miao X, Wang J, *et al*. Functional Phe31Ile polymorphism in Aurora A and risk of breast carcinoma. *Carcinogenesis*. 2005; 25(11):2225-2230.

Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003.

Tong D, Fabjani Gm Heinze G, *et al*. Analysis of the human progesterone receptor gene polymorphism progins in Austrian ovarian carcinoma patients. *International Journal of Cancer*. 2001; 95(6):394-297.

Terry PD, Rohan TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2002; 11:953–971.

Thulerl LCS, Mendonça GA. Initial staging of breast and cervical cancer in Brazilian women. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 2005; 27(11):656-660.

Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Egan KM, *et al*. Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes and Control*. 2000; 11(6):533-542.

Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Statistics in Medicine*. 2004; 24(1):1111-1130.

Van Duijnhoven FJ, Bezemer ID, Peeters PH, *et al*. Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and mammographic density. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2005; 14(11): 2655-2660.

Van Duijnhoven FJ, Peeters PH, Warren RM, *et al*. Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy

on mammographic density. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2006; 15(3):462-467.

Van Meurs JB, Schuit SCE, Weel, *et al.* Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Human Molecular Genetics*. 2003; 12:1745-1754.

Veronesi U, Luini A; Costa A, *et al.* Mastologia oncológica, p.242, 2002.

Wang J, Higuchi R, Modugno F, *et al.* Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007; 106(2):273-280.

Wang-Gohrke S, Chang-Claude J, Becher H, *et al.* Progesterone receptor gene polymorphism is associated with decreased risk for breast cancer by age 50. *Cancer Research*. 2000; 60(9):2348-2350.

Ward E, Jemal A, Cokkinides V, *et al.* Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004; 54:78-93.

Wartenberg D, Calle EE, Thun MJ, *et al.* Passive smoking exposure and female breast cancer mortality. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(20):1666-1673.

Weitzen R, Tichler T, Kaufman B, *et al.* Body weight, nutritional factors and physical activity--their influence on prognosis after breast cancer diagnosis. *Harefuah*. 2006; 145(11):820-825.

Weel AE, Unitterlinden AG, Westendorp IC, *et al.* Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 1999; 84:3146-3150.

Wild C. Polymorphisms-screening: genetic testing for predisposition – guidance for technology assessment. *Poiesis Prax*. 2008; 5:1–14

Willett WC. Diet and cancer. *Oncologist*. 2000; 5(5):393-404.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2 to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994; 265:2088-90.

Wünsch Filho VE, Mocau JE. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: Padrões Regionais e Tendências Temporais. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2002; 48(3):250-257.

Xiaotao L, O'Malley. Unfolding The Action of Progesterone Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(41):39261-39264.

Yamada Y, Ando F, Niino N, *et al.* Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *Journal Molecular Medicine.* 2002; 80:452-460.

5. MANUSCRITOS

5.1 MANUSCRITO 1: Submitted to “*Genetics and Molecular Biology*”

Prevalence of breast cancer risk factors and *ERα-397 PvuII C/T* and *ERα-351 XbaI A/G* polymorphisms and *PR* PROGINS polymorphisms in women submitted to mammographic screening in Southern Brazil.

Juliana Giacomazzi^{1,2,3}, Ernestina Aguiar^{1,2,3}, Edenir Inêz Palmero⁴, Aishameriane Venes Schmidt⁵, Giovana Skonieski³, Dakir Duarte Filho³, Hugo Bock^{6,7}, Maria Luiza Saraiva Pereira^{6,7,8,9}, Ingrid Petroni Ewald^{1,2}, Lavínia Schuler-Faccini^{9,10,11}, Suzi Alves Camey¹², Maira Caleffi³, Roberto Giugliani^{1,6,9,10,11}, Patrícia Ashton-Prolla^{1,2,3,9,10,11}

- (1) Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas; Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (2) Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
- (3) Núcleo Mama Porto Alegre, Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil
- (4) International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- (5) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- (6) Laboratório de Identificação Genética, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
- (7) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- (8) Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
- (9) Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
- (10) Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (11) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (12) Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

SHORT TITLE: *ER* and *PR* gene polymorphisms in Southern Brazil.

KEY WORDS: genetic polymorphisms, estrogen receptor gene, progesterone receptor gene, breast cancer susceptibility, breast cancer

CORRESPONDING AUTHOR:

Patrícia Ashton-Prolla, MD, PhD
Departamento de Genética – UFRGS e
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
90035-903 Porto Alegre RS
Brazil
e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br
Tel.: + 55 51 2101-8011 / Fax: + 55 51 2101-8010

ABSTRACT

In this study, we have determined the allelic and genotypic frequencies of the *ERα*-397 *PvuII* C/T, *ERα*-351 *XbaI* A/G and *PR PROGINS* polymorphisms and investigated their relationship with established breast cancer risk factors. We studied 750 breast cancer-unaffected women enrolled in a mammographic screening program in Southern Brazil, a region with particularly high breast cancer incidence rates. Genotypic frequencies for *PROGINS* were not significantly different from previous studies in Brazilian and non-Brazilian individuals. The distribution of *ERα* genotypes, however, was significantly different from most of the previously published reports. Furthermore, the distribution of *ERα* haplotypes was also found to be distinct from that described in other populations. No significant reproductive risk factors for breast cancer were identified in the sample. However, mean body mass index was 29.6 and 41.1% of the women had a body mass index ≥ 30 . A significant association was found between the *ERα*-351 GG genotype and menarche ≥ 14 years. In addition, postmenopausal women with A2A2 and A1A2 *PR PROGINS* genotypes had a higher estimated 5-year risk of developing breast cancer and had a higher mean body mass index. No significant associations were encountered between breast density and the three polymorphisms studied.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most prevalent form of cancer in women worldwide (*World Health Organization* 2008). In Brazil, BC is a significant public health problem, due to its morbidity, and high incidence and mortality rates. It is the first cause of cancer-related deaths in women of all ages, about half of the affected women are diagnosed in advanced stages of the disease, and not surprisingly, mortality rates are still increasing. Porto Alegre, Brazil's southernmost capital, has one of the highest BC incidence rates in the country, estimated at 85.5 per 100.000 individuals for the year 2008 as compared to the average national rate of 51.0 per 100.000 individuals (Gonçalves *et al.* 2007; Instituto Nacional do Câncer, INCA, 2008).

Mammary carcinogenesis is a complex multistage process, which has not been entirely elucidated and cancer phenotype at presentation, clinical course and response to treatment show significant variation among affected individuals. This variation is likely associated and/or determined by a complex set of environmental and genetic factors, which are unique to each patient and may include the influence of drugs, chemicals and nutritional habits, individual immunologic and hormonal aspects and the combined effect of polymorphisms in low penetrance genes (Coughlin *et al.* 1999; Dunning *et al.* 1999; Wild 2008).

Polymorphisms in genes coding for hormone receptors have been linked to an increased risk for BC in different populations. Among these, estrogen receptor (*ER*) and progesterone receptor (*PR*) genes are widely studied in different populations.

In the breast, estrogens bind to specific receptors with high affinity, triggering DNA synthesis, cell division, and proliferation of the breast epithelial cells (Bernstein *et al.* 1998). Two types of estrogen receptors have been identified, estrogen receptor α ($ER\alpha$) and β ($ER\beta$) and the former, also named *ESR1*, is an important mediator of hormonal response in estrogen-sensitive tissues such as breast, endometrium, and bone (Shin *et al.* 2003; Onland-Moret *et al.* 2005). The *ER α* gene is mapped to 6q25.1 and its two most commonly described SNPs are *ER α -397 PvuII C/T* (rs2234693) and *ER α -351 XbaI A/G* (rs9340799). Both are in strong linkage disequilibrium and have been associated with an increase in BC risk (Zuppan *et al.* 1989). Most studies report that this increase is associated with the *ER α -397 T* and *ER α -351 A* alleles (Andersen *et al.* 1994; Shin *et al.* 2003; Onland-Moret *et al.* 2005; Hu *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007). The *ER α -397 TT* genotype has been particularly associated with an increased risk of BC diagnoses at a younger age, and some studies have suggested that this genotype is more frequent in women with a positive family history of the disease (Parl *et al.* 1989; Shen *et al.* 2006). Furthermore, Van Duijnhoven *et al.* (2006) suggested that the *ER α -397 T* allele and the *ER α -351 A* allele modulate the effect of hormone replacement therapy (HRT) as a risk factor for the disease and on mammographic density. In an independent study, the same authors also demonstrated an association between the presence of the *ER α -397 T* and *ER α -351 A* alleles and increased mammographic density regardless of HRT. The *ER α -397 TT* genotype was further associated with a higher number of pregnancies, later age at menarche and use of oral contraceptives. The *ER α -351 AA* genotype was associated with a slight increase in body mass index (BMI) which could ultimately influence BC risk

(Van Duijnhoven *et al.* 2005). Finally, a few haplotype studies involving both the *ERα-397 PvuII C/T* and *ERα-351 XbaI A/G* polymorphisms indicate that the increase in breast cancer risk may be particularly significant in the presence of certain haplotypes, for instance, the *ERα-397 - ERα-351 A-A-T-T* haplotype, that is associated with a relative risk (RR) for BC of 1.5 (Onland-Moret *et al.* 2005; Jakimiuk *et al.* 2007). There is no report on the genotypic and/or allelic frequencies of the *ERα-397 PvuII C/T* and *ERα-351 XbaI A/G* polymorphisms and their associated BC risk in Brazilian individuals.

Progesterone participates in the regulation of most female reproductive processes, targeting the ovaries (release of mature oocytes), uterus (promotion of implantation and maintenance of pregnancy), and mammary glands (suppression of lactation before parturition) (Graham *et al.* 1997). The biological actions of progesterone are mediated by the progesterone receptor (*PR*), which belongs to the steroid-retinoic acid receptor superfamily and is encoded by a single copy gene located on chromosome 11q22-23 (Rousseau-Merck *et al.* 1987). *PROGINS* (rs1042838), one of the most widely studied polymorphisms in the *PR* gene, has been associated with abnormal gene expression and has a complex structure, consisting of a 306-bp *Alu* insertion in intron 7 and two sequence variations in exons 4 and 5 of the *PR* gene, *Val660Leu* and *His770His* (De Vivo *et al.* 2002). The polymorphic allele has been denominated *A2* and its wildtype counterpart, *A1*. Theoretically, women carrying the *PROGINS* (*A2*) allele would have an increased risk of developing malignancies in organs where progesterone exposure has a protective effect, such as ovary and endometrium (Modugno 2004; Pijnenborg *et al.* 2005; Romano *et al.* 2006). In the breast, where progesterone exposure has no

protective effect, but rather stimulates cell proliferation, *PROGINS* theoretically would reduce the risk of BC (Dunning *et al.* 1999).

Although a few studies reported an association of *PROGINS* with increased lifetime risk for developing BC (Garret *et al.* 1995; Kieback *et al.* 1998). Data are conflicting and several other studies showed an inverse relationship (Manolitsas *et al.* 1997; Lancaster *et al.* 1998; Dunning *et al.* 1999; Pearce *et al.* 2005). An overt protective effect of the *PR A2* allele was described by Wang-Gohrke (2000) in premenopausal women. The only Brazilian study on the association of *PROGINS* with BC cancer risk showed no statistically significant difference in its frequency between BC cases and controls (Linhares *et al.* 2005).

Given the scarce data on the frequency and relevance of these polymorphisms in relation to BC risk in Brazilian women, this study aimed to determine the genotypic and allelic frequencies of common *ER* and *PR* gene polymorphisms in a sample of women undergoing mammographic screening in an area with high BC incidence and mortality rates.

MATERIALS AND METHODS

Study population and data collection

The study population consisted of breast cancer-unaffected women (ages ranging from 40 to 69 years) enrolled in a mammographic screening program in the city of Porto Alegre, Southern Brazil. This program is maintained within the Nucleo Mama Porto Alegre (NMPOA) study, a cohort started in April 2004 that intends to

collect demographic and epidemiologic data and follow women recruited from 19 primary care units (PCU) for 10 years (Caleffi *et al.* 2005; Smith *et al.* 2006). Women enrolled in this study were residents of 7 regions of the city of Porto Alegre, that together comprehend 305 Km² or 64.0% of its area and about 35.0% of its total population. All study subjects were regular users and relied almost exclusively on the PCU system for health care. Although specific demographic data on this population of PCU clients is unavailable, data of the most recent municipal census indicate that in these regions, 49.2% of the inhabitants have less than 8 years of education (5.6% are illiterate), 20.0% live in temporary homes and 6.5% of providers have no income, suggesting that study subjects are derived from an underserved area (Observatório da cidade de Porto Alegre 2008; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2008).

A consecutive sample of 890 women submitted to annual mammographic screening was invited for this study during a period of four months (November 2005 – March 2006) and the first 750 that agreed to participate were included after signature of informed consent. Study approval was obtained from ethics committees of the participating institutions. Demographic and clinical information as well as results from screening were obtained from data collected at the PCU and chart review.

Study variables

Study variables included age at recruitment, age at first childbirth, age at menarche and menopause, parity, BMI, race (white or non-white, assessed by self-

denomination), results of the mammographic examination and breast density (using the *BIRADS* and breast density categories of the American College of Radiology 1998), previous breast biopsies, use of HRT and/or oral contraceptives and estimated 5-year and lifetime risk of developing breast cancer according to the Gail model (Gail *et al.* 1998).

Genotype studies

Genomic DNA was obtained from peripheral blood samples using standard methods (Miller *et al.* 1988). Genotyping of the *ER α -397 PvuII C/T* and *ER α -351 XbaI A/G* polymorphisms was performed using a TaqMan PCR assay and the 7500 Real Time PCR Equipment (*Applied Biosystems*, Foster City, CA), with fluorescent minor groove binding probes according to the manufacturer's instructions. After PCR, fluorescence was measured on an ABI 7500 Sequence Detector (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). Genotyping of the *PROGINS* polymorphism was based on the PCR amplification of a fragment encompassing the 306-bp insertion in intron 7. The *A1* allele was defined as "absence of the insertion", according to previous citations (Rowe *et al.* 1995; Wang-Gohrke *et al.* 2000). The PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis and visualized under UV light. The *A1* allele appeared as a 175 bp fragment and the *PROGINS (A2)* allele, as a 481 bp fragment.

Statistical analysis

SPSS version 14.0 was used for data handling and statistical analyses. For descriptive analysis, categorical variables were described by their absolute and/or

relative frequencies and quantitative variables were expressed as mean and standard deviation (SD). For analytical statistics, *t test* for independent variables and ANOVA were used to compare mean values of the quantitative variables. The existence of an association between categorical variables, the comparison of genotype frequencies and the deviation of the genotype frequencies from those expected were examined by chi-square. In all analyses a significance level of 0.05 was adopted. Comparative analysis of genotypic frequencies among this and other studies was done using the WINPEPI (PEPI-for-Windows) (Abramson 2004).

RESULTS

Mean age at inclusion was 51 years (SD: 7.6) and 420 (56.0%) women were postmenopausal at recruitment. The majority of women (n= 623, 83.1%) reported past or actual use of oral contraceptives, but only 118 (15.7%), past or actual use of HRT. The mean estimated lifetime risk of developing breast cancer in the overall sample was 7.8% (DP: 3.3). Data on BC risk factors identified in the sample are summarized in Table 1.

All women were submitted to screening mammography and most (97.5%) had normal image results (*BIRADS* 1 or *BIRADS* 2). Regarding mammographic density, 413 (55.1%) women had dense breast tissue in approximately 25-50% of the breast and 269 (35.9%) had dense tissue in more than 51% of the breast.

The allelic and genotypic frequencies of the *ERα-397 Pvull C/T*, *ERα-351 XbaI A/G* and *PROGINS* polymorphisms are presented in Table 2. Genotypic frequencies of all three polymorphism studied were significantly different from

those described in other studies of Caucasian, African-American and Asian populations worldwide but not of the few studies with Brazilian individuals (see Tables in supplementary materials). The distribution of genotypes for these polymorphisms in the overall sample, and in both white and non-white women followed the Hardy-Weinberg equilibrium. There were no significant differences of observed allelic and genotypic frequencies in white and non-white women ($p > 0.05$).

The *ER α -397* genotypes for the *PvuII C/T* polymorphism (*TT* and *CT* versus *CC* genotypes) were correlated with several BC risk factors (age at first childbirth, age at menarche and menopause, parity, BMI, breast density, use of HRT and/or oral contraceptives and estimated 5-year and lifetime risk of developing breast cancer) and no significant association of a particular genotype, or genotype combinations with any of these variables was found.

For the *ER α -351 XbaI A/G* polymorphism and its genotypes (*AA* + *AG* versus *GG*) a significant association of the *GG* genotype with age at menarche (≥ 14 years) was found ($p = 0.02$).

Post-menopausal women with *A2A2* and *A1A2 PR PROGINS* genotypes had a higher estimated 5-year risk of developing BC (M: 1.16, DP: 0.44, $p = 0.04$) and a higher average BMI (M: 31.41, DP: 0.65) compared to women with *A1A1* genotype (M: 29.75, DP: 0.37, $p = 0.03$).

Finally, haplotype frequencies of the two *ER* polymorphisms were assessed (Table 3). No significant association was observed between the haplotype theoretically associated with highest risk (*A-A-T-T*) versus other haplotypes in relation to breast density ($p = 0.47$), mean BMI ($p = 0.90$), mean estimated lifetime

risk of developing BC ($p = 0.12$), and mean ages at menarche ($p = 0.31$) and menopause ($p = 0.75$).

DISCUSSION

Normal breast tissue proliferation is highly influenced by the action of steroid hormones and their action is mediated by specific receptors. The current literature shows that in certain populations, specific polymorphisms in hormone receptor genes may be associated with an increased risk of developing BC. Knowledge on the allelic and genotypic frequency of such polymorphisms and their interaction with other BC risk factors, may be helpful to identify women at higher risk for the disease. In this study, we describe, in a sample of Brazilian women, the allelic and genotypic frequencies of selected polymorphisms in the *ER* and *PR* genes that have been previously shown to modify BC risk in other populations and describe their relationship with established BC risk factors.

Genotypic frequencies observed for the *PR PROGINS* polymorphism, were comparable to those reported in other studies with Brazilian and non-Brazilian populations (Wang-Gohrke *et al.* 2000; Fabjani *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004; Romano *et al.* 2005; Linhares *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2006). On the other hand, genotypic frequencies of the *ER α* gene polymorphisms were significantly different from those described in most studies from other populations emphasizing the importance of the population-specific determination of such frequencies (Shin *et al.* 2003; Onland-Moret *et al.* 2005; Shen *et al.* 2005; Van Duijnhoven *et al.* 2006; Hu *et al.* 2007; Hsieh *et al.* 2007; Molvarec *et al.* 2007).

No significant reproductive risk factors for BC were identified in the sample of women studied; i.e. mean age at menarche was above 12 years, mean age at first childbirth was well below age 30 years, mean age at menopause was below the age of 50 years and only a small proportion of women were nulliparous. However, mean BMI was well above 25 and a significant proportion of women studied had a BMI \geq 30.

Considering this unexpected prevalence of overweight and obesity in this unselected population-based sample of women, and that the *ER α* gene has been implicated in adiposity, lipid metabolism and feeding behavior, we also investigated a possible relationship between these polymorphisms and BMI, but no significant correlation was identified (Fox *et al.* 2005; Nilsson *et al.* 2007). Interestingly, the *PR PROGINS A2* allele (associated previously with an increased risk of breast cancer), occurred significantly more often in women with a BMI \geq 30 as compared to those with a BMI $<$ 25. Progesterone receptor, the product of the *PR* gene, mediates interactions between the estrogen, insulin and IGF hormonal pathways and hyperinsulinemia, increased free IGF and increased circulating estrogen concentrations have each been associated with obesity in postmenopausal women (Vassen *et al.* 1999; Wasserman *et al.* 2004). However, a direct association of this polymorphism with increased body weight remains elusive and additional studies are necessary to clarify the relevance of this observation and ultimately, its relationship with increased BC risk.

Regarding other established risk factors for BC, our finding of a significant association between the *ER α -351 GG* genotype and age at menarche \geq 14 years is opposite to a previous report where menarche tended to occur 6 months later in

girls with the *ERα*-351 AA genotype (Jakimiuk *et al.* 2007). It is well known that *ERα* gene polymorphisms can impact the maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, which determines the onset of menarche (Yoo *et al.* 2002; Jakimiuk *et al.* 2007) and thus, although the exact biological mechanism explaining the relationship between *ERα*-351 *Xba*I A/G and age at menarche remains unknown, one could hypothesize that the association between the *ERα*-351 AA genotype and increased BC risk could at least in part be influenced by reproductive features such as earlier age at menarche. On the other hand, presence of the *ERα*-351 GG genotype and its association with menarche at a later age could constitute a protective effect in relation to BC risk, but this remains to be confirmed in additional studies. Finally, we also identified a higher estimated 5-year risk of developing BC in post-menopausal women carrying the *PROGINS* A2 allele. This observation is in accordance with previous reports that this allele is associated with an increased risk for BC, but additional investigations, including case-control studies, are necessary to examine this hypothesis in more detail.

The distribution of *ERα*-351 *Xba*I - *ERα*-397 *Pvu*II haplotypes was significantly different from that previously observed in populations of European and Asian ethnicity and approached that observed in only one previous study with a small sample of African and African-American individuals. This is unexpected because, although the contemporary Brazilian population is highly admixed, the African contribution to the genetic pool in Southern Brazil is quite low, as compared to other regions of the country, with clear predominance of European alleles. Price *et al.* (2007), for instance, have estimated that African and European ancestry correspond to 11% and 71% of the alleles in Brazilian individuals. Alves-Silva *et al.*

(2000), studying mitochondrial (mtDNA) and nuclear alleles had already described a differential distribution of Amerindian, African and European alleles and found a surprisingly high African and Amerindian contribution in white Brazilian individuals (Alves-Silva *et al.* 2000; Price *et al.* 2007). However, in Southern Brazil, the major contribution was still European, both in mitochondrial (66%) and nuclear (79%) DNA. Thus, our observation of an haplotype distribution that is entirely different from all other reports in European populations is surprising and warrants further investigation. Finally, the observed frequency of the *px* haplotype, theoretically associated with an increased risk of BC, was the lowest among all of the studies published previously, and the inverse was observed for the *PX* haplotype.

Although a few significant associations between selected *ER* and *PR* polymorphisms and BC risk factors were identified in this population-based sample of women from a region with a high BC incidence rate, additional case-control studies are necessary to determine if they are indeed associated with an increased risk for the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The Núcleo Mama (NMAMA) Cohort, from which the patients derive, is maintained by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency from Porto Alegre. The authors are indebted to Giovana Skonieski, Bernardete Weber, Karen Barboza de Pereira, Ademar Bedin Júnior, Fávio Marcel Telis Gonzalez, Luciano Artico and the NMPOA team for their help with the recruitment of the patients included in this study. This study was supported in part by grants from

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saude no. 06/2005, processo 400949/2005-9, Brazil; Susan G Komen for the Cure (population specific grant number POP0403033) and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA, Brazil (grant number 05-182). PA-P is supported by CNPq and JG received a fellowship from CAPES.

REFERENCES

- Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): Computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives and Innovations*. 2004; 1(6):1-10.
- Albagha OM, Mc Guigan FE, Reid DM, *et al*. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: Haplotype analysis in women from the United Kingdom. *Journal of Bone Mineral Research*. 2001; 16:128-134.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, *et al*. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *American Journal of Human Genetics*. 2000; 67(2):444-461.
- American College of Radiology. Illustrated breast imaging reporting and data system (BIRADS). Reston: American College of Radiology, 3th edition, 1998.
- Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, *et al*. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Human Genetics*. 1994; 94(6):665-670.
- Becherini L, Gennari L, Masi L, *et al*. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Human and Molecular Genetics*. 2000; 9:2043-2050.
- Bernstein JL, Thompson WD, Risch N, *et al*. The genetic epidemiology of second primary breast cancer. *American Journal of Epidemiology*. 1992; 136:937-948.
- Brazilian Institute for Geography and Statistics (IBGE). *Brazil: demographic data*. Available in: <http://www.ibge.gov.br>. Cited 03 June 2007.
- Caleffi M, Ashton-Prolla P, Weber B, *et al*. Breast cancer screening in 10.000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23(16S):877.

Carvalho CV, D' Amora P, Sato H, *et al.* Polimorfismo do Gene do Receptor de Progesterona (*PROGINS*) em Mulheres com Endometriose Pélvica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2004; 26(8):613-617.

Coughlin SS, Piper M. Genetic Polymorphisms and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1999; 8:1023-1032.

De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, *et al.* A Functional Polymorphism in the Progesterone Receptor Gene is Associated with an Increase in Breast Cancer Risk. *Cancer Research*. 2003; 63:5236-5238.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, *et al.* A Systematic Review of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1999; 8:843-854.

Fabjani G, Tong D, Czerwenka K, *et al.* Human Progesterone receptor gene polymorphism *PROGINS* and risk for breast cancer in Austrian women. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2002; 72(2):131-137.

Fox CS, Yang Q, Cupples LA, *et al.* Sex-specific association between estrogen receptor-alpha gene variation and measures of adiposity: the Framingham Heart Study. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90:6257-6262.

Gail MH, Brinton LA, Byar DP, *et al.* Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998; 81:1879-1886.

Garret E, Rowe SM, Coughlan SJ, *et al.* Mendelian inheritance of a TaqI restriction fragment length polymorphism due to an insertion in the human progesterone receptor gene and its allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Research, Therapy and Control*. 1995; 4:217-222.

Gennari L, Merlotti D, De Paola V, *et al.* Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*. 2005; 161:307-320.

Gomes MTV, Castro RA, Villanova FE, *et al.* Relação entre polimorfismo do gene do receptor de progesterona, raça, paridade e ocorrência de leiomioma uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2006; 28(5):278-284.

Gonçalves ATC, Costa Jobim PF, Vanacor R, *et al.* Increase in breast cancer mortality in Southern Brazil from 1980 to 2002. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007; 23(8):1785-90.

Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*. 1997; 18:502-519.

Han K, Choi J, Moon I, *et al.* Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turnover in Korean pre-, peri- and postmenopausal women. *Osteoporosis International*. 1999; 9:290-295.

Hu Z, Song CG, Lu JS, *et al.* A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER Alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/BRCA2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133(12):969-978.

Hsieh YY, Wang YK, Chang CC. Estrogen receptor alpha -351 *Xba*I*G and -397 *Pvu*II*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma. *Molecular Human Reproduction*. 2007; 13(2):117-122.

Instituto Nacional do Câncer (INCa). Available in: <http://www.inca.gov.br>. Cited 10 February 2008.

Jakimiuk AJ, Nowicka M, Bogusiewicz M, *et al.* Prevalence of estrogen receptor α *Pvu*II and *Xba*I polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 2007; 45(4):331-338.

Kieback DG, Tong X, Weigel NL, *et al.* A genetic mutation in progesterone receptor (*PROGINS*) leads to an increased risk of non-familial breast and ovarian cancer causing inadequate control of estrogen receptor driven proliferation. *Journal of the Society Gynecologic Investigation*. 1998; 5(1):40A.

Kobayashi S, Inoue S, Hosoi L, *et al.* Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *Journal of Bone Mineral Research*. 1996. 11:306-311.

Lancaster JM, Berhuck A, Carney ME, *et al.* Progesterone receptor gene polymorphism a risk for breast and ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 1998; 78:227.

Linhares JJ, Silva IDCG, Souza, NCN, *et al.* Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (*PROGINS*) em mulheres com câncer de mama: estudo caso-controle. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2005; 27(8):473-478.

Manolitsas TP, Englefield P, Eccles DM, *et al.* No association of a 306-bp insertion polymorphism in the progesterone gene with ovarian and breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1997; 75(9):1398-1399.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:1215.

Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, *et al.* Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. *Bone*. 1997; 21:379-383.

Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 2004; 159(4):319-335.

Molvarec A, Ver A, Fekete A, *et al.* Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertension Research*. 2007; 30(3):205-211.

Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M, *et al.* Estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 382(1-2):100-105.

Nilsson M, Dahlman I, Ryden M, *et al.* Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *International Journal of Obesity*. 2007; 31(6):900-907.

Observatório da cidade de Porto Alegre. Available in: <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/observatorio>. Acessado em Maio de 2007.

Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chnprasertyothin S, *et al.* Serum oestradiol and oestrogen-receptor gene polymorphism are associated with bone mineral density independently of serum testosterone in normal males. *Clinical Endocrinology*. 1998; 49:803-809.

Onland-Moret NC, Van Gils CH, Roest M, *et al.* The estrogen receptor α gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes and Control*. 2005; 16:1195-1202.

Parl FF, Cavener DR, Dupont WD. Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1989; 14(1):57-64.

Patel MS, Cole DE, Smith JD, *et al.* Alleles of estrogen receptor α gene and estrogen cotranscriptional activator gene, amplified in breast cancer-1 (AIB1), are associated with quantitative calcaneal ultrasound. *Journal of Bone Mineral Research*. 2000; 15:2231-2239.

Pearce CL, Hirschhorn JN, Wu AH, *et al.* Clarifying the PROGENS allele association in ovarian and breast cancer risk: a haplotype-based analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005; 97(1):51-59.

Pijnenborg JM, Romano A, Dam-de Veen GC, *et al.* Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma. *Journal of Pathology*. 2005; 205(5):597-605.

Price AL, Patterson N, Yu F, *et al.* A Genomewide Admixture Map for Latin American Populations. *The Journal of Human Genetics*. 2007; 80:1024-1036.

Romano A, Lindsey PJ, Fisher DC, *et al.* Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2006; 101(2):287-295.

Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, *et al.* Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q 22-q23. *Human Genetics*. 1987; 77:280-282.

Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ, *et al.* Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Research*. 1995; 55:2743-2745.

Shen Y, Li D, Wu J, *et al.* Joint effects of the CYP1A1 MspI, ER α PvuII, and ER α PvuII polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2006; 15(2):342-347.

Shin A, Kang D, Nishio H, *et al.* Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2003; 80:127-131.

Smith RA, Caleffi M, Albert U-S, *et al.* Breast cancer in limited-resource countries: early detection and access to care. *The Breast Journal*. 2006; 12(Suppl 1):S16-S26.

Van Meurs JB, Schuit SCE, Weel, *et al.* Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Human Molecular Genetics*. 2003; 12:1745-1754.

Van Duijnhoven FJ, Bezemer ID, Peeters PH, *et al.* Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and mammographic density. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2005; 14(11): 2655-2660.

Van Duijnhoven FJ, Peeters PH, Warren RM, *et al.* Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy on mammographic density. *Cancer Epidemiol, Biomarkers and Prevention*. 2006; 15(3):462-467.

Vassen L, Deslypere JP, Paridaens R, *et al.* Human insulin receptor substrate-2 (IRS-2) is a primary progesterone response gene. *Molecular Endocrinology*. 1999; 13:485-494.

Zuppan PJ, Hall JM, Ponglikitmongkol M, *et al.* Polymorphisms at the estrogen receptor (ESR) locus and linkage relationships on chromosome 6q. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1989; 51:1116.

Yamada Y, Ando F, Niino N, *et al.* Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *Journal of Molecular Medicine*. 2002; 80:452-460.

Yoo KY, Kang D, Park, *et al.* Epidemiology of breast cancer in Korea: occurrence, high-risk groups, and prevention. *Journal of Korean Medical Science*. 2002; 17:1-6.

Wang-Gohrke S, Chang-Claude J, Becher H, *et al.* Progesterone receptor gene polymorphism is associated with decreased risk for breast cancer by age 50. *Cancer Research*. 2000; 60(9):2348-2350.

Wang J, Higuchi R, Modugno F, *et al.* Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007; 106(2):273-280.

Wang S, Ray N, Rojas W, *et al.* Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genetics*. 2008; 4(3):1-9.

Wasserman L, Flatt SW, Natarajan L, *et al.* Correlates of obesity in postmenopausal women with breast cancer: comparison of genetic, demographic, disease-related, life history and dietary factors. *International Journal of Obesity*. 2004; 28:49-56.

Wild C. Polymorphisms-screening: genetic testing for predisposition – guidance for technology assessment. *Poiesis Prax*. 2008; 5:1–14

Willing M, Sowers M, Aron D, *et al.* Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *Journal of Bone Mineral Research*. 1998; 13:695-705.

World Health Organization webpage. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>. Accessed: June, 2008.

Table 1. Breast cancer risk factors in the sample studied (n=750).

Variable	n (%)	Mean	SD
Age at assessment (years)	---	51.0	7.6
Age at menarche (years)	---	13.0	1.8
Age at first childbirth (years)	---	22.0	5.3
Nulliparous	30 (4.0)	---	---
Postmenopausal (%)	420 (56.0)	---	---
Age at menopause (years)	---	47.0	5.5
Use of hormone replacement	118 (28.1)	---	---
Body mass index (kg/m ²)	---	29.6	5.8
≤18.4	6 (0.8)	---	---
18.5-24.99	162 (21.6)	---	---
25-29.99	274 (36.5)	---	---
≥30	308 (41.1)	---	---
Previous breast biopsy	40 (5.3)	---	---

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of the *ERα-397 PvuII C/T*, *ERα-351 XbaI A/G* and *PR PROGINS* polymorphism in the overall sample (n= 750), and in white (n= 599) and non-white women (n= 151).

Name	Genotypic frequencies n (%)			Allelic Frequencies		p-value*	H-W**
<i>ERα-397 PvuII C/T</i>	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>T</i>	<i>C</i>		
overall	242 (32.3)	356 (47.5)	152 (20.2)	0.56	0.44	---	1.00
white	195 (32.5)	286 (47.8)	118 (19.7)	0.56	0.44	---	0.50
non-white	47 (31.1)	70 (46.4)	34 (22.5)	0.54	0.46	---	0.66
						0.74	
<i>ERα-351 XbaI A/G</i>	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>		
overall	347 (46.3)	313 (41.7)	90 (12.0)	0.67	0.33	---	2.20
white	270 (45.1)	255 (42.6)	74 (12.3)	0.66	0.34	---	1.30
non-white	77 (51.0)	58 (38.4)	16 (10.6)	0.70	0.30	---	1.00
						0.42	
<i>PROGINS</i>	<i>A2A2</i>	<i>A1A2</i>	<i>A1A1</i>	<i>A2</i>	<i>A1</i>		
overall	15 (2.0)	191 (25.5)	544 (72.5)	0.15	0.85	---	0.14
white	13 (2.2)	158 (26.4)	428 (71.4)	0.15	0.85	---	0.13
non-white	2 (1.3)	33 (21.9)	116 (76.8)	0.12	0.88	---	0.04
						0.39	

*p-value= white versus non-white

**H-W = Hardy-Weinberg Equilibrium

Table 3. Frequencies of the *ERα-397 PvuII* - *ERα-351 XbaI* haplotypes.

Haplotypes			p-value	<i>PX</i>		<i>Px</i>		<i>pX</i>		<i>px</i>	
	Origin	Country		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Present study *	Brazil	Brazil	**	401	53.5	107	14.3	2	0.3	240	32.0
Van Meurs <i>et al.</i> 2003	Africa and USA	USA/Sub-Saharan Africa***	0.64	19	50.0	3	13.6	0	0	7	36.8
Patel <i>et al.</i> 2000	Europea	Canada	<0.01	236	35.6	63	9.5	0	0	363	54.9
Becherini <i>et al.</i> 2000	Europea	Italy	<0.01	249	40.9	35	5.7	8	1.3	318	52.1
Bagger <i>et al.</i> 2000	Europea	Denmark	<0.01	153	33.7	60	13.3	0	0	241	53.0
Albagha <i>et al.</i> 2001	Europea	UK	<0.01	69	33.5	19	9.2	2	12.0	116	56.1
Kobayashi <i>et al.</i> 1996	Asia	Korea	<0.01	44	18.7	63	26.5	1	0.3	130	54.5
Han <i>et al.</i> 1999	Asia	Korea	<0.01	110	18.5	129	21.5	14	2.3	345	57.7
Yamada <i>et al.</i> 2002	Asia	Korea	<0.01	410	18.3	499	22.3	0	0	1329	59.4

***Haplotype definitions and frequencies obtained in the present study:**

PX: C-C-G-G (n=87, 11.6%), C-C-G-A (n=57, 7.6%), C-T-G-G (n=3, 0.4%), C-T-G-A (n=254, 33.9%).

Px: C-C-A-A (n=8, 1.1%), C-T-A-A (n=99, 13.2%).

pX: T-T-G-G (n=0, 0%), T-T-G-A (n=2, 0.3%).

px: T-T-A-A (n=240, 32.0%).

**p-value between white and non-white women in the present study = 0.13

***10 samples from African-American individuals and 9 samples from African individuals deposited in the Coriell Institute (Camden, NJ, USA).

Supplementary Materials

Table 4 – Frequency of *ERα*-397 *PvuII* C/T polymorphism in the present study and in other studies.

Genotypic Frequencies			Allelic Frequencies		n	p value	Country	References
<i>TT</i> - n (%)	<i>TC</i> - n (%)	<i>CC</i> - n (%)	<i>T</i> (%)	<i>C</i> (%)				
242 (32.3)	356 (47.5)	152 (20.2)	0.56	0.44	750		Brazil	present study
64 (32.8)	105 (53.9)	26 (13.3)	0.59	0.41	195	0.07	Korea	Shin <i>et al.</i> 2003
61 (40.7)	61 (40.7)	28 (18.6)	0.61	0.39	150	0.13	Shangai	Shen <i>et al.</i> 2005
88 (21.0)	153 (36.4)	96 (22.9)	0.49	0.51	337	<0.001	Denmark	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
208 (26.8)	402 (51.8)	166 (21.4)	0.53	0.47	776	<0.001	Holand	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
207 (26.7)	385 (49.7)	183 (23.6)	0.51	0.49	775	<0.001	Holand	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
21 (32.8)	32 (40.7)	11 (17.2)	0.58	0.42	64	0.10	Poland	Jakimiuk <i>et al.</i> 2007
49 (43.4)	45 (39.8)	19 (16.8)	0.64	0.36	113	<0.001	China	Hu <i>et al.</i> 2007
27 (24.1)	68 (40.7)	17 (15.2)	0.54	0.46	112	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
60 (54.5)	44 (40.7)	6 (5.5)	0.75	0.25	110	0.08	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
25 (23.6)	75 (70.8)	6 (5.6)	0.59	0.41	106	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
29 (26.4)	50 (45.4)	31 (28.2)	0.51	0.49	110	<0.001	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
45 (25.0)	94 (52.2)	41 (22.8)	0.51	0.49	180	<0.001	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
16 (28.6)	28 (50.0)	12 (21.4)	0.54	0.46	56	0.02	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
7 (33.3)	8 (38.1)	6 (28.6)	0.52	0.48	21	0.07	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
3 (27.3)	7 (63.6)	1 (9.1)	0.59	0.41	11	0.51	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007

Table 5 – Frequency of ER α -351 XbaI A/G polymorphism in the present study and in other studies

Genotypic Frequencies			Allelic Frequencies		n	p-value	Country	References
AA - n (%)	AG - n (%)	GG - n (%)	A (%)	G (%)				
347 (46.3)	313 (41.7)	90 (12.0)	0.67	0.33	750		Brazil	present study
86 (44.1)	102 (52.3)	7 (3.6)	0.70	0.30	195	0.001	Korea	Shin <i>et al.</i> 2003
92 (61.4)	47 (31.3)	11 (7.3)	0.77	0.33	150	0.003	Shangai	Shen <i>et al.</i> 2005
123 (29.3)	151 (36.0)	61 (14.5)	0.60	0.40	335	0.003	Denmark	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
41 (32.0)	362 (46.4)	98 (12.6)	0.56	0.44	780	0.02	Holand	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
308 (39.7)	371 (47.9)	96 (12.4)	0.64	0.36	775	0.007	Holand	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
38 (59.4)	22 (34.4)	4 (6.25)	0.77	0.33	64	0.10	Poland	Jakimiuk <i>et al.</i> 2007
68 (61.8)	35 (31.8)	7 (6.4)	0.77	0.33	110	0.007	China	Hu <i>et al.</i> 2007
30 (26.8)	64 (57.1)	18 (16.1)	0.55	0.45	112	0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
37 (33.6)	71 (64.6)	2 (1.8)	0.66	0.34	220	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
21 (19.8)	56 (52.8)	29 (27.4)	0.59	0.41	106	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
15 (24.6)	31 (50.8)	15 (24.6)	0.50	0.50	61	0.001	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2006
23 (39.7)	31 (53.4)	4 (6.9)	0.66	0.34	58	0.18	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2006
41 (37.3)	47 (42.7)	22 (20.0)	0.59	0.41	110	0.04	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
60 (33.3)	93 (51.7)	27 (15.0)	0.59	0.41	180	0.007	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
19 (33.9)	29 (51.8)	8 (14.3)	0.60	0.40	56	0.20	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
7 (33.3)	10 (47.6)	4 (19.1)	0.57	0.43	21	0.42	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007
4 (36.4)	6 (54.5)	1 (9.1)	0.64	0.36	11	0.69	Hungary	Molvarec <i>et al.</i> 2007

Table 6 – Frequency of *PR PROGINS* polymorphism in the present study and in other studies

Genotypic Frequencies			Allelic Frequencies		n	p-value	Country	References
A1A1 - n (%)	A1A2 - n (%)	A2A2 - n (%)	A1 (%)	A2 (%)				
544 (72.5)	191 (25.5)	15 (2.0)	0.85	0.15	750		Brazil	present study
393 (71.0)	144 (26.0)	17 (3.0)	0.84	0.16	554	0.44	Germany	Wang-Gohrke <i>et al.</i> 2000
78 (73.6)	28 (26.4)	0 (0)	0.74	0.26	106	0.34	Austria	Fabjani <i>et al.</i> 2002
30 (79.0)	7 (18.0)	1 (0.3)	0.88	0.12	38	0.61	Brazil	Carvalho <i>et al.</i> 2004
31 (65.3)	17 (34.6)	1 (2.1)	0.80	0.20	49	0.36	Brazil	Linhares <i>et al.</i> 2005
42 (62.7)	24 (35.8)	1 (1.5)	0.81	0.19	67	0.18	Holand	Romano <i>et al.</i> 2005
98 (78.4)	24 (19.2)	3 (2.4)	0.88	0.12	125	0.32	Brazil	Gomes <i>et al.</i> 2006

5.2. MANUSCRITO 2: Submitted to “*The Breast Journal*” - *Short Communication*

Prevalence of the *STK15 F31I* polymorphism and its relationship with breast cancer risk factors in women submitted to mammographic screening in Southern Brazil.

Juliana Giacomazzi^{1,2,3}, Ernestina Aguiar^{1,2,3}, Edener Inêz Palmero⁴, Aishameriane Venes Schmidt⁵, Giovana Skonieski³, Dakir Duarte Filho³, Hugo Bock^{6,7}, Maria Luiza Saraiva Pereira^{6,7,8,9}, Lavínia Schuler-Faccini^{9,10,11}, Suzi Alves Camey¹², Maira Caleffi³, Roberto Giugliani^{1,6,9,10,11}, Patrícia Ashton-Prolla^{1,2,3,9,10,11}

- (1) Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas; Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (2) Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
- (3) Núcleo Mama Porto Alegre, Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil
- (4) International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- (5) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- (6) Laboratório de Identificação Genética, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
- (7) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- (8) Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
- (9) Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
- (10) Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (11) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (12) Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

RUNNING TITLE: *STK15 F31I* polymorphism: prevalence in Southern Brazil

KEY WORDS: genetic polymorphisms, *STK15*, breast cancer susceptibility, breast cancer

CORRESPONDING AUTHOR:

Patrícia Ashton-Prolla, MD, PhD
Departamento de Genética – UFRGS e
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
90035-903 Porto Alegre RS
Brazil
e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br
Tel.: + 55 51 2101-8011
Fax: + 55 51 2101-8010

ABSTRACT

STK15 (Aurora-A) is a serine-threonine kinase involved in formation of the mitotic spindle and is considered a potential cancer susceptibility gene due to its function in cell mitosis. A single-nucleotide polymorphism in the gene, nt 91T>A, results in the polymorphic substitution of isoleucine (*Ile*) for phenylalanine (*Phe*) at residue 31 (*F31I*) and has been associated with an increased risk of breast cancer. In this study, we have determined the allelic and genotypic frequencies of this polymorphism and investigated its relationship with established breast cancer risk factors in 750 healthy women undergoing annual mammographic screening in Southern Brazil. The mean estimated lifetime risk of developing breast cancer in the sample was 7.8% and most (97.5%) of the women had normal mammographic image results (*BIRADS* 1 or 2). In pre-menopausal women, the *STK15 F31I AT* and *AA* genotypes were encountered significantly more often in pre-menopausal women with moderately dense (50-75%) breast tissue, whereas the *STK15 F31I TT* genotype was found more often in those with less dense (0-50%) breast tissue. In addition, the *STK15 F31I TT* genotype was significantly associated with a later age at menarche (≥ 12 years). Genotypic frequencies observed in this study were significantly different from most previous of the previous reports in other populations, emphasizing the need for population-specific analyses in the evaluation of its association with breast cancer risk. The *STK15 F31I AA* genotype, associated with an increased risk for breast cancer, occurred at a frequency similar to that observed in predominantly European populations.

Breast cancer (BC) is a significant public health problem in South America, being the most common malignancy among women [1]. In Brazil, BC incidence and mortality rates continue to rise despite significant efforts to establish mammographic screening programs across the country. Southern Brazilian states have particularly high incidence rates, in the range of most countries in Europe and North America, and this is likely a consequence of life style among women in this region (e.g. decreasing number of term pregnancies, significant prevalence of overweight and obesity across age groups, increasing use of hormone replacement therapy). The influence of environmental factors and of the genetic background of the population (the region has received the highest proportion of European immigrants of the country during the last two centuries) must also be considered [2,3].

Several genetic polymorphisms associated with an increased risk of BC have been identified in genes involved with hormone metabolism, carcinogen metabolism as well as in some high penetrance alleles such as *TP53* [4]. Polymorphisms in the *STK15* gene have been recently described and an association with BC risk has been proposed. The *STK15* gene (also known as *AURKA*, *STK6*, and *BTAK*) encodes *Aurora-A*, a serine-threonine kinase that acts as key regulator of mitotic chromosome segregation and is particularly involved in the passage from the G_2 to the M phase of cell cycle [5,6]. Defects in chromatid segregation cause genetic instability, a condition that is clearly associated with tumorigenesis [7]. Due to the regulatory function of *STK15* gene in the cell cycle, it has been hypothesized to be a potential cancer susceptibility gene. A single-nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide 91, nt91 T>A, results in the

substitution of phenylalanine by isoleucine in codon 31 (*F31I*) and affects the function of the *STK15* gene [6].

The first study reporting an association of the *STK15 F31I* polymorphism with BC described a statistically significant increased risk (OR: 1.76, CI 95%: 1.29-2.12) in women with the *AA STK15 F31I* genotype [8]. A second study reported an increase in breast cancer risk in association with both the *AT STK15 F31I* (OR: 1.3, CI 95%: 1.0-1.7) and *AA STK15 F31I* genotypes (OR: 1.2, CI 95%: 0.9-1.6) (Dai *et al.* 2004). An association between overweight (body mass index - BMI ≥ 25) and these genotypes was also described (OR: 3.3, CI 95%: 1.4-7.7 for the *AT STK15 F31I* genotype, and OR: 4.1, CI 95%: 1.7-9.8 for the *AA STK15 F31I* genotype). The same authors hypothesized that the association of *STK15* genotype, BC risk and increased BMI could be further modified by factors related to increased endogenous exposure to estrogen including enhanced peripheral metabolism, early menarche, late menopause and later age at first childbirth. Although additional studies have reported an association between the *AA STK15 F31I* genotype and overall BC risk in relation to BMI, results are conflicting with increased risk being associated to post-menopausal women with and without an increased BMI [9,10].

This study aimed to determine the genotypic and allelic frequencies of the *STK15 F31I* polymorphism in a sample of women undergoing mammographic screening and derived from a population in Southern Brazil with both, a high prevalence of overweight and obesity, as well as high BC incidence and mortality rates.

A consecutive and unselected sample of 750 breast cancer-unaffected women (ages 40-69 years) enrolled in a mammography screening program in the city of Porto Alegre (*Núcleo Mama Porto Alegre* – NMPOA Cohort) was recruited for this study during routine mammographic visits between November 2005 and March 2006 [12,13]. Study approval was obtained from the ethics committees of the participating institutions and all individuals recruited for the study signed informed consent. Demographic and clinical information as well as results from mammographic screening were obtained from chart review.

Study variables included age at recruitment, age at first childbirth, age at menarche and menopause, parity, BMI (classified in 3 categories : ≤ 18.5 ; 18.5-25; ≥ 25), race (white or non-white, assessed by self-denomination), results of the mammographic examination and breast density (using the *BIRADS* and breast density categories of the American College of Radiology 1998), previous breast biopsies, use of hormone replacement therapy (HRT) and/or oral contraceptives, estimated 5-year risk and estimated lifetime risk of developing cancer according to the Gail model [14,15].

Genomic DNA was obtained from peripheral blood samples using standard methods [16]. Genotyping was performed using the TaqMan PCR assay (Assays-on-Demand, *Applied Biosystems*, Foster City, CA) for the *STK15 F31I* polymorphism (rs2273535, C_25623289_10), with fluorescent minor groove binding probes and the 7500 Real Time PCR Equipment (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. After PCR, fluorescence was measured on an ABI 7500 Sequence Detector (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

SPSS version 14.0 was used for data handling and statistical analyses. For descriptive analysis, categorical variables were described by their absolute and/or relative frequencies and quantitative variables were expressed as mean and standard deviation (SD). For analytical statistics, *t test* for independent variables and ANOVA were used to compare mean values of the quantitative variables. The existence of an association between categorical variables, the comparison of genotype frequencies and the deviation of the genotype frequencies from those expected were examined by chi-square. In all analyses a significance level of 0.05 was adopted. Comparative analysis of genotypic frequencies among this and other studies was done using the WINPEPI (PEPI-for-Windows) [17].

Data on BC risk factors identified in the sample is presented in Table 1. Mean age at inclusion of the women enrolled in the present study was 51 years (SD: 7.6), 420 (56.0%) women were postmenopausal, and the mean estimated lifetime risk of developing BC in the overall sample using the Gail model was 7.8% (SD: 3.3). All women were submitted to screening mammography and most (97.5%) had benign image results (*BIRADS* 1 or 2). Regarding mammographic density, a significant proportion of women had dense breasts: 413 (55.1%) women had 25-50% of dense breast tissue and 269 (35.9%), had > 51% dense breast tissue.

The allelic and genotypic frequencies of the *STK15 F31I* polymorphism are presented in table 2. The distribution of genotypes for this polymorphism in the overall sample, as well as that of the self-denominated groups of white and non-white women was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium (H-W: 3.22; 3.83;

0.02, respectively). There were no significant differences of observed allelic and genotypic frequencies in white and non-white women ($p > 0.05$).

A significant association was observed between presence of the *STK15 F31I TT* genotype and late age at menarche (≥ 12 years; $p = 0.02$). Furthermore, in pre-menopausal women, the *STK15 F31I AT* and *AA* genotypes were significantly associated with moderately dense (50-75%) breast tissue, and the *STK15 F31I TT* genotype, with less dense (0-50%) breast tissue ($p = 0.02$).

No significant association was identified between the *STK15 F31I* polymorphism and age at menopause ($p = 0.80$) and estimated lifetime risk of developing breast cancer ($p = 0.95$).

Several studies have now identified the *STK15 F31I* polymorphism as a low-penetrance risk allele for BC but its prevalence and risk association to cancer in the Brazilian population have not been determined. Compelled by a possible association of the *STK15 F31I* polymorphism with BMI we performed this study in a population-based sample of women submitted to mammographic screening and derived from a geographic area in Brazil with a high prevalence of overweight and obesity and of high BC incidence rates.

Genotypic frequencies encountered in this study were similar with those described in other predominantly European populations [6,11,18,19] and significantly distinct from those observed among Asians. This is not unexpected because, although the contemporary Brazilian population is highly admixed, there is predominance of European alleles, especially in the formation of the genetic pool of Southern Brazil. Price *et al.* (2007), for instance, have estimated that African and European ancestry correspond to 11% and 71% of the alleles in Brazilian

individuals and Alves-Silva *et al.* (2000), described a major contribution of European alleles in both mitochondrial (66%) and nuclear (79%) DNA in populations from Southern Brazil [20,21]. An interesting observation is that the frequency of homozygotes for the *STK15 F31I A* allele (risk genotype AA) is 7-fold higher in the Asian (Chinese) populations studied so far than in the sample studied here and other European populations. In Chinese women, BC incidence rates are significantly lower than those observed in Western countries and in Brazil [22].

We also investigated a possible association between the *STK15 F31I* polymorphism and indicators of prolonged estrogen exposure. BC risk is known to be influenced by prolonged estrogen stimulation and it has been hypothesized that loss of function effect of certain *STK15* sequence variations could potentially be enhanced in women with higher exposure, either endogenous or exogenous, to the mitogenic influence of estrogen [23]. A significant association encountered in the present study was between the *STK15 F31I TT* genotype (associated with lower breast cancer risk in the literature) and late menarche (≥ 12 years). No significant association was found between the *STK15 F31I* polymorphism and age at menopause, age at first childbirth, BMI and use of HRT.

Finally, the *STK15 F31I* risk genotype (AA) was more frequently observed among pre-menopausal women with dense breast tissue. If indeed an association of this genotype and increased BC risk is established in the future, this finding could have important implications for BC screening strategies in pre-menopausal women from this population. Additional studies are needed to clarify the relationship between the *STK15 F31I* polymorphism and BC in this and other populations.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The Núcleo Mama (NMAMA) Cohort, from which the patients derive, is maintained by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency from Porto Alegre. The authors are indebted to Giovana Skonieski, Bernardete Weber, Karen Barboza de Pereira, Ademar Bedin Júnior, Fávio Marcel Telis Gonzalez, Luciano Artico and the NMPOA team for their help with the recruitment of the patients included in this study. This study was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saude n° 06/2005, processo 400949/2005-9, Brazil; Susan G Komen for the Cure (population specific grant number POP0403033) and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA, Brazil (grant number 05-182). PA-P is supported by CNPq and JG received a fellowship from CAPES.

REFERENCES

- [1] *World Health Organization Database*. <http://www.who.int/infobase>. Accessed: March 2008.
- [2] McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal*. 2001; 321:624-8.
- [3] Schwartzmann G. Breast Cancer in South America: Challenges to Improve Early Detection and Medical Management of a Public Health Problem. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19:118-124.
- [4] Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, *et al*. A Systematic Review of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1999; 8:843-854.
- [5] Dutertre S, Descamps S, Prigent C. On the role of Aurora-A in centrosome function. *Oncogene*. 2002; 21:6175-6183.
- [6] Ewart-Toland A, Briassouli P, de Koning JP, *et al*. Identification of STK6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nature Genetics*. 2003; 34:403-412.
- [7] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998; 396:643-649.
- [8] Sun T, Miao X, Wang J, *et al*. Functional Phe31Ile polymorphism in Aurora A and risk of breast carcinoma. *Carcinogenesis*. 2004; 25:2225-2230.
- [9] Dai Q, Cai Q, Shu X, *et al*. Synergistic Effects of STK15 Gene Polymorphisms and Endogenous Estrogen Exposure in the Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2004; 13:2065-2070.
- [10] Cox DX, Hankinson SE, Hunter DJ. Polymorphisms of the *AURKA* (*STK15/Aurora Kinase*) Gene and Breast Cancer Risk (United States). *Cancer Causes and Control*. 2006; 14(1):81-83.
- [11] Egan KM, Newcomb PA, Ambrosone CB, *et al*. STK15 polymorphism and breast cancer risk in a population-based study. *Carcinogenesis*. 2004; 25(11):2149-53. Errata: *Carcinogenesis*. 2005; 26(3):701.
- [12] Caleffi M, Ashton-Prolla P, Weber B, *et al*. Breast cancer screening in 10.000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23(16S):877.

- [13] Smith RA, Caleffi M, Albert U-S, *et al.* Breast cancer in limited-resource countries: early detection and access to care. *The Breast Journal*. 2006; 12(Suppl 1):S16-S26.
- [14] American College of Radiology. Illustrated breast imaging reporting and data system (*BIRADS*). Reston: American College of Radiology, 3th edition, 1998.
- [15] Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, *et al.* Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998; 81:1879-1886.
- [16] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16:1215.
- [17] Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): Computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives and Innovations*. 2004; 1(6):1-10.
- [18] Fletcher O, Johnson N, Palles C, *et al.* Inconsistent association between the *STK15* F31I Genetic Polymorphism and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006; 19;98(14):1014-1018.
- [19] Gu J, Gong Y, Huang M, *et al.* Polymorphisms of *STK15* (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. *Carcinogenesis*. 2007; 28(2):350-355.
- [20] Price AL, Patterson N, Yu F, *et al.* A Genomewide Admixture Map for Latin American Populations. *The Journal of Human Genetics*. 2007; 80:1024-1036.
- [21] Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, *et al.* The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *American Journal of Human Genetics* 2000; 67(2):444–461.
- [22] Tavassoli FA, Devillee P (Eds). World Health Organization. Classification of Tumour. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC PRESS*: Lyon, 2003, p.13.
- [23] Persson I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers – evidence and hypotheses from epidemiological findings. *The Journal of Steroids Biochemistry Molecular Biology*. 2000; 74(5):357-364.

Table 1. Breast cancer risk factors in the sample studied (n=750).

Variable	n (%)	Mean	SD
Age at assessment (years)	---	51.0	7.6
Age at menarche (years)	---	13.0	1.8
Age at first childbirth (years)	---	22.0	5.3
Nulliparous	30 (4.0)	---	---
Postmenopausal (%)	420 (56.0)	---	---
Age at menopause (years)	---	47.0	5.5
Use of hormone replacement	118 (28.1)	---	---
Body mass index (kg/m ²)	---	29.6	5.8
≤18.4	6 (0.8)	---	---
18.5-24.99	162 (21.6)	---	---
25-29.99	274 (36.5)	---	---
≥30	308 (41.1)	---	---
Previous breast biopsy	40 (5.3)	---	---

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of the *STK15 F31I* polymorphism in the overall sample (n=750), and in white (n=599) and non-white women (n=151).

	Genotypic frequencies n (%)			Allelic Frequencies		H-W*
	AA	AT	TT	A	T	
overall	34 (4.5)	291 (38.7)	425 (56.6)	0.24	0.76	3.23
white	25 (4.2)	234 (39)	340 (56.8)	0.24	0.76	3.82
non-white	9 (5.9)	57 (37.8)	85 (56.3)	0.25	0.75	0.02

*H-W = Hardy-Weinberg Equilibrium
p-value = 0.91 between white and non-white.

Table 3. Genotypic and allelic frequencies of the *STK15 F31I* polymorphism in breast cancer-unaffected women in the present study and in other studies.

Genotypic Frequencies			Allelic Frequencies		n	p-value	Country	References
AA - n (%)	AT - n (%)	TT - n (%)	A (%)	T (%)				
34 (4.5)	291 (38.7)	425 (56.7)	0.24	0.76	750		Brazil	present study
192 (36.9)	262 (50.4)	66 (12.7)	0.62	0.38	520	<0.001	China	Sun <i>et al.</i> 2004
81 (42.4)	85 (44.5)	25 (13.1)	0.65	0.35	191	<0.001	China	Sun <i>et al.</i> 2004
534 (45.0)	503 (42.4)	149 (12.6)	0.66	0.34	1186	<0.001	China	Dai <i>et al.</i> 2004
886 (45.0)	887 (45.0)	196 (10.0)	0.68	0.32	1969	<0.001	Taiwan	Lo <i>et al.</i> 2005
31 (3.7)	283 (34.1)	516 (62.2)	0.21	0.79	830	0.082	United States	Egan <i>et al.</i> 2004
21 (4.7)	148 (33.0)	279 (62.3)	0.21	0.79	448	0.131	United States	Ewart-Toland <i>et al.</i> 2005
48 (5.5)	280 (32.0)	547 (62.5)	0.21	0.79	875	0.015	United Kingdom	Fletcher <i>et al.</i> 2006
56 (5.5)	332 (32.3)	639 (62.2)	0.22	0.78	1027	0.017	United States	Gu <i>et al.</i> 2007

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações finais serão apresentadas de acordo com os resultados obtidos a partir dos objetivos propostos originalmente.

O objetivo principal do presente estudo foi caracterizar uma amostra de 750 mulheres com idade entre 40-69 anos quanto à presença e frequência dos polimorfismos *ERα-351 XbaI A/G* e *ERα-397 PvuII C/T* do gene receptor de estrogênio (*ER*), *PROGINS* do gene receptor de progesterona (*PR*) e *STK15 F31I* do gene da serina-treonina quinase (*STK15*), correlacionando os achados moleculares com fatores de risco para CM nesta amostra.

É importante contextualizar o presente estudo como uma ramificação de um projeto maior de acompanhamento prospectivo (coorte de no mínimo 10 anos) de 4040 mulheres cadastradas em 19 unidades de atenção básica à saúde, pertencentes ao Programa Saúde da Família na zona Sul de Porto Alegre. Um número total de 9218 mulheres, atendidas nessas unidades foram arroladas a este estudo de coorte entre Março de 2004 e Março de 2006 e serão acompanhadas por no mínimo 10 anos pelo projeto Saúde da Mama Nucleo Mama Porto Alegre. Atualmente, entre estas 9218, 4040 mulheres com idades entre 40 e 69 anos de idade, realizam rastreamento mamográfico anual. Desde o início da coorte, este programa de rastreamento mamográfico identificou 48 casos de CM e espera-se que a partir de agora cerca de 6-7 casos sejam diagnosticados a cada ano. Os dados apresentados no presente estudo servirão de base para identificar, nas pacientes com e sem CM identificadas ao longo dos 10 anos de acompanhamento da coorte, quais são os fatores de risco mais prevalentes para a doença. Adicionalmente, estudos caso-controle utilizando esta amostra poderão definir se algum(ns) dos

polimorfismos aqui estudados realmente tem associação com o desenvolvimento de CM e qual o risco real associado.

Sendo o CM uma doença altamente prevalente no RS (o Estado é o segundo em incidência de CM entre mulheres no país), fatores de risco para a doença já estabelecidos na literatura foram utilizados para a caracterização clínica da amostra.

Observou-se que como um todo o grupo estudado não apresentou fatores de risco reprodutivos marcantes para a doença, sendo a idade média na menarca idade relativamente tardia (13 anos, DP: 1.8), a idade média na menopausa precoce (47 anos, DP: 5.5), sendo identificado um pequeno percentual de mulheres nulíparas (4%) e sendo a idade média ao nascimento do primeiro filho também precoce (22 anos, DP: 5.3). No entanto, observou-se que 36.5% e 41.1% da amostra apresentavam IMC entre 25 e 29.99 e ≥ 30 , respectivamente. Portanto, 77.6% das mulheres incluídas no estudo apresentavam IMC correspondente a sobrepeso ou obesidade, um dado surpreendente e que precisa ser investigado em maior detalhe para determinar se esta é realmente a situação nas demais mulheres da região que se encontram nesta faixa etária.

A maioria das mulheres incluídas no estudo (n= 623, 83.1%) relataram uso atual ou passado de ACO, mas apenas 118 (15.7%), uso atual ou passado de TRH. O risco vital médio de desenvolver CM de acordo com o modelo de Gail na amostra foi de 7.8% (DP: 3.3) e a grande maioria das pacientes (n= 731, 97.5%) apresentaram achados mamográficos benignos (*BIRADS* 1 ou 2). Por fim, a distribuição das mulheres de acordo com densidade mamográfica, demonstrou que apesar de 56% das mulheres já estarem na pós-menopausa, a maioria (n= 682, 91.0%) ainda apresentava mamas moderadamente densas, com 25-50% de tecido fibroglandular (n= 413, 55.1%).

Em relação às freqüências gênicas e genótípicas dos polimorfismos estudados, observou-se que a freqüência dos polimorfismos *ERα-351 XbaI A/G* e *ERα-397 PvuII C/T* encontradas neste estudo diferiu significativamente das encontradas em estudos prévios. Para o polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G* a freqüência do alelo *A* foi 0.67 e a freqüência do alelo *T* foi 0.33. A distribuição genotípica estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg com as seguintes freqüências: genótipo *AA* 46.3%, genótipo *AG* 41.7% e *GG* 12.0%. Para o polimorfismo *ERα-351 PvuII C/T* a freqüência do alelo *T* foi 0.56 e a freqüência do alelo *C* foi 0.44. A distribuição genotípica estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg com as seguintes freqüências: genótipo *TT* 32.3%, genótipo *CT* 47.5% e *CC* 20.2%. Os haplótipos de *ERα-351 XbaI - ERα-397 PvuII* foram analisados e observou-se que o haplótipo teoricamente associado a maior risco para CM (*px*) apresentou a menor freqüência quando comparado a todos estudos identificados em populações não-brasileiras, e que o haplótipo teoricamente de menor risco, *PX*, apresentou a mais alta freqüência na amostra deste estudo, em comparação com os demais estudos prévios. Como um todo, as freqüências dos haplótipos *ERα-351 XbaI - ERα-397 PvuII* diferiram significativamente de todos os estudos analisados, com exceção de um estudo realizado em pequena amostra de indivíduos Afro-Americanos e Africanos. Para o polimorfismo *PR PROGINS* a freqüência do alelo *A2* foi 0.15 e a freqüência do alelo *A1* foi 0.85. A distribuição genotípica estava também em equilíbrio de Hardy-Weinberg com as seguintes freqüências: genótipo *A2A2* 2.0%, genótipo *A1A2* 25.5% e *A1A1* 72.5%. As freqüências genótípicas do polimorfismo *PROGINS* foram similares àquelas previamente descritas em populações brasileiras e não-brasileiras. Por fim, para o polimorfismo *STK15 F31I*, a freqüência do alelo *A* foi 0.24 e a freqüência do alelo *T* foi 0.76. A distribuição genotípica estava em equilíbrio de

Hardy-Weinberg com as seguintes freqüências: genótipo *AA* 4.5%, genótipo *AT* 38.7% e *TT* 56.6%. As freqüências genóticas para este polimorfismo diferiram significativamente da maioria dos relatos prévios em populações não-brasileiras. Em todas as análises, não houve diferença estatisticamente significativa entre indivíduos auto-denominados brancos e não-brancos, reforçando noções prévias acerca da baixa confiabilidade de tal classificação.

Por fim, foram realizadas análises de associação entre os diferentes genótipos dos quatro polimorfismos estudados e fatores de risco estabelecidos para CM. Os resultados obtidos demonstraram que houve uma associação significativa entre : (a) o genótipo *GG* (associado a menor risco) de *ER α -351* e menarca tardia (≥ 14 anos), (b) os genótipos *A2A2* e *A2A1* de *PR PROGINS* e maior risco médio estimado de desenvolver CM em 5 anos em mulheres pós-menopáusicas, (c) os genótipos *A2A2* e *A1A2* de *PR PROGINS* e maior IMC em mulheres pós-menopáusicas; (d) os genótipos *AT* e *AA* de *STK15 F31I* e tecido mamário moderadamente denso (50-75% da mama apresentando componente fibroglandular) em mulheres pré-menopáusicas; (e) genótipo *TT* do *STK15 F31I* e tecido lipossustituído ou moderadamente lipossustituído (0-50% da mama apresentando componente fibroglandular e (f) genótipo *TT* do *STK15 F31I* e idade na menarca ≥ 12 anos.

Conclui-se que, embora algumas relações significativas tenham sido encontradas entre diferentes alelos e genótipos dos polimorfismos aqui estudados, estudos adicionais do tipo caso-controle são necessários para determinar a relação de risco destas variantes de baixa penetrância com a ocorrência de CM em mulheres do Sul do Brasil. As freqüências gênicas e genóticas obtidas no presente estudo poderão servir como referência para futuras investigações nesta e em outras populações.

7. ANEXOS

7.1. Freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados

7.1.1. Polimorfismo ER α -397 PvuII C/T

Tabela 9. Polimorfismo ER α -397 PvuII C/T em mulheres com câncer de mama

Freqüências Genotípicas			Freqüências Alélicas		n	p-value	País de origem	Referências
TT - n (%)	TC - n (%)	CC - n (%)	T (%)	C (%)				
75 (37.3)	91 (45.3)	35 (17.4)	0.59	0.41	201	0.36	Coréia	Shin <i>et al.</i> 2003
55 (39.8)	63 (45.7)	20 (14.5)	0.63	0.37	138	0.13	Shangai	Shen <i>et al.</i> 2005
89 (28.9)	150 (48.7)	69 (22.4)	0.53	0.47	308	<0.001	Dinamarca	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
408 (39.0)	509 (48.2)	135 (12.8)	0.63	0.37	1052	<0.001	China	Boyapatti <i>et al.</i> 2005
39 (34.5)	58 (51.3)	16 (14.2)	0.60	0.40	113	0.31	China	Hu <i>et al.</i> 2007

Tabela 10. Polimorfismo ER α -397 PvuII C/T em mulheres sem câncer de mama

Freqüências Genotípicas			Freqüências Alélicas		n	p-value	País de origem	Referências
TT - n (%)	TC - n (%)	CC - n (%)	T (%)	C (%)				
242 (32.3)	356 (47.5)	152 (20.2)	0.56	0.44	750		Brasil	neste estudo
64 (32.8)	105 (53.9)	26 (13.3)	0.59	0.41	195	0.07	Coréia	Shin <i>et al.</i> 2003
61 (40.7)	61 (40.7)	28 (18.6)	0.61	0.39	150	0.13	Shangai	Shen <i>et al.</i> 2005
88 (21.0)	153 (36.4)	96 (22.9)	0.49	0.51	337	<0.001	Dinamarca	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
208 (26.8)	402 (51.8)	166 (21.4)	0.53	0.47	776	<0.001	Holanda	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
207 (26.7)	385 (49.7)	183 (23.6)	0.51	0.49	775	<0.001	Holanda	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
21 (32.8)	32 (40.7)	11 (17.2)	0.58	0.42	64	0.10	Polônia	Jakimiuk <i>et al.</i> 2007
49 (43.4)	45 (39.8)	19 (16.8)	0.64	0.36	113	<0.001	China	Hu <i>et al.</i> 2007
27 (24.1)	68 (40.7)	17 (15.2)	0.54	0.46	112	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
60 (54.5)	44 (40.7)	6 (5.5)	0.75	0.25	110	0.08	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
25 (23.6)	75 (70.8)	6 (5.6)	0.59	0.41	106	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
29 (26.4)	50 (45.4)	31 (28.2)	0.51	0.49	110	<0.001	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
45 (25.0)	94 (52.2)	41 (22.8)	0.51	0.49	180	<0.001	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
16 (28.6)	28 (50.0)	12 (21.4)	0.54	0.46	56	0.02	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
7 (33.3)	8 (38.1)	6 (28.6)	0.52	0.48	21	0.07	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
3 (27.3)	7 (63.6)	1 (9.1)	0.59	0.41	11	0.51	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007

7.1.2. Polimorfismo *ESRα-351 XbaI A/G*

Tabela 11. Polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G* em mulheres com câncer de mama

Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas		n	p-value	País de origem	Referências
AA - n (%)	AG - n (%)	GG - n (%)	A (%)	G (%)				
130 (64.7)	60 (29.8)	11 (5.5)	0.80	0.20	201	<0.001	Coréia	Skin <i>et al.</i> 2003
88 (63.3)	43 (30.9)	8 (5.8)	0.79	0.21	139	0.001	Shangai	Shen <i>et al.</i> 2005
122 (40.0)	130 (42.3)	55 (17.9)	0.61	0.39	307	0.022	Dinamarca	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
531 (50)	493 (46.5)	36 (3.5)	0.73	0.27	1060	<0.001	China	Boyapatti <i>et al.</i> 2005
76 (67.2)	34 (30.1)	3 (2.7)	0.82	0.18	113	<0.001	China	Hu <i>et al.</i> 2007

Tabela 12. Polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G* em mulheres sem câncer de mama

Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas		n	p-value	País de origem	Referências
AA - n (%)	AG - n (%)	GG - n (%)	A (%)	G (%)				
347 (46.3)	313 (41.7)	90 (12.0)	0.67	0.33	750		Brasil	neste estudo
86 (44.1)	102 (52.3)	7 (3.6)	0.70	0.30	195	0.001	Coréia	Shin <i>et al.</i> 2003
92 (61.4)	47 (31.3)	11 (7.3)	0.77	0.33	150	0.003	Shangai	Shen <i>et al.</i> 2005
123 (29.3)	151 (36.0)	61 (14.5)	0.60	0.40	335	0.003	Dinamarca	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
41 (32.0)	362 (46.4)	98 (12.6)	0.56	0.44	780	0.02	Holanda	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
308 (39.7)	371 (47.9)	96 (12.4)	0.64	0.36	775	0.007	Holanda	Van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
38 (59.4)	22 (34.4)	4 (6.25)	0.77	0.33	64	0.10	Polônia	Jakimiuk <i>et al.</i> 2007
68 (61.8)	35 (31.8)	7 (6.4)	0.77	0.33	110	0.007	China	Hu <i>et al.</i> 2007
30 (26.8)	64 (57.1)	18 (16.1)	0.55	0.45	112	0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
37 (33.6)	71 (64.6)	2 (1.8)	0.66	0.34	220	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
21 (19.8)	56 (52.8)	29 (27.4)	0.59	0.41	106	<0.001	China	Hsieh <i>et al.</i> 2007
15 (24.6)	31 (50.8)	15 (24.6)	0.50	0.50	61	0.001	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2006
23 (39.7)	31 (53.4)	4 (6.9)	0.66	0.34	58	0.18	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2006
41 (37.3)	47 (42.7)	22 (20.0)	0.59	0.41	110	0.04	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
60 (33.3)	93 (51.7)	27 (15.0)	0.59	0.41	180	0.007	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
19 (33.9)	29 (51.8)	8 (14.3)	0.60	0.40	56	0.20	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
7 (33.3)	10 (47.6)	4 (19.1)	0.57	0.43	21	0.42	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007
4 (36.4)	6 (54.5)	1 (9.1)	0.64	0.36	11	0.69	Hungria	Molvarec <i>et al.</i> 2007

7.1.3. Polimorfismo *PR PROGINS*

Tabela 13. Polimorfismo *PR PROGINS* em mulheres com câncer de mama

Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas		n	p-value	País de origem	Referências
<i>A1A1</i> - n (%)	<i>A1A2</i> - n (%)	<i>A2A2</i> - n (%)	<i>A1</i> (%)	<i>A2</i> (%)				
426 (76.1)	128 (23.0)	5 (0.9)	0.88	0.12	559	0.134	Alemanha	Wang-Gohrke <i>et al.</i> 2000
119 (76.8)	32 (20.6)	4 (2.6)	0.77	0.23	155	0.420	Austria	Fabjani <i>et al.</i> 2002
109 (89.3)	12 (9.8)	1 (0.8)	0.94	0.06	122	<0.001	Brasil	Gomes <i>et al.</i> 2006

Tabela 14. Polimorfismo *PR PROGINS* em mulheres sem câncer de mama

Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas		n	p-value	País de origem	Referências
<i>A1A1</i> - n (%)	<i>A1A2</i> - n (%)	<i>A2A2</i> - n (%)	<i>A1</i> (%)	<i>A2</i> (%)				
544 (72.5)	191 (25.5)	15 (2.0)	0.85	0.15	750		Brasil	neste estudo
393 (71.0)	144 (26.0)	17 (3.0)	0.84	0.16	554	0.44	Alemanha	Wang-Gohrke <i>et al.</i> 2000
78 (73.6)	28 (26.4)	0 (0)	0.74	0.26	106	0.34	Austria	Fabjani <i>et al.</i> 2002
30 (79.0)	7 (18.0)	1 (0.3)	0.88	0.12	38	0.61	Brasil	Carvalho <i>et al.</i> 2004
31 (65.3)	17 (34.6)	1 (2.1)	0.80	0.20	49	0.36	Brasil	Linhares <i>et al.</i> 2005
42 (62.7)	24 (35.8)	1 (1.5)	0.81	0.19	67	0.18	Holanda	Romano <i>et al.</i> 2005
98 (78.4)	24 (19.2)	3 (2.4)	0.88	0.12	125	0.32	Brasil	Gomes <i>et al.</i> 2006

7.1.4. Polimorfismo *STK15 F31I*

Tabela 15. Polimorfismo *STK15 F31I* em mulheres com câncer de mama

Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas		n estudo	p-value	País de origem	Referências
<i>TT</i> - n (%)	<i>AT</i> - n (%)	<i>AA</i> - n (%)	<i>A</i> (%)	<i>T</i> (%)				
559 (59.5)	331 (35.2)	50 (5.3)	0.23	0.77	940	0.281	Estados Unidos	Egan <i>et al.</i> 2004
121 (11.0)	491 (44.6)	490 (44.5)	0.67	0.33	1102	<0.001	China	Dai <i>et al.</i> 2004
50 (9.6)	214 (41.1)	256 (49.3)	0.70	0.30	520	<0.001	China	Sun <i>et al.</i> 2004
71 (10.0)	288 (40.7)	348 (49.3)	0.70	0.30	707	<0.001	Taiwan	Lo <i>et al.</i> 2005
533 (59.4)	303 (33.7)	62 (6.9)	0.24	0.76	894	0.025	Estados Unidos	Ewart-Toland <i>et al.</i> 2005
335 (66.1)	154 (30.3)	18 (3.6)	0.19	0.81	507	0.004	Reino Unido	Fletcher <i>et al.</i> 2006
688 (62.7)	372 (33.9)	38 (3.5)	0.20	0.80	1098	0.031	Estados Unidos	Gu <i>et al.</i> 2007

Tabela 16. Polimorfismo *STK15 F31I* em mulheres sem câncer de mama

Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas		n	p-value	País de origem	Referências
<i>AA</i> - n (%)	<i>AT</i> - n (%)	<i>TT</i> - n (%)	<i>A</i> (%)	<i>T</i> (%)				
34 (4.5)	291 (38.7)	425 (56.7)	0.24	0.76	750		Brasil	neste estudo
192 (36.9)	262 (50.4)	66 (12.7)	0.62	0.38	520	<0.001	China	Sun <i>et al.</i> 2004
81 (42.4)	85 (44.5)	25 (13.1)	0.65	0.35	191	<0.001	China	Sun <i>et al.</i> 2004
534 (45.0)	503 (42.4)	149 (12.6)	0.66	0.34	1186	<0.001	China	Dai <i>et al.</i> 2004
886 (45.0)	887 (45.0)	196 (10.0)	0.68	0.32	1969	<0.001	Taiwan	Lo <i>et al.</i> 2005
31 (3.7)	283 (34.1)	516 (62.2)	0.21	0.79	830	0.082	Estados Unidos	Egan <i>et al.</i> 2004
21 (4.7)	148 (33.0)	279 (62.3)	0.21	0.79	448	0.131	Estados Unidos	Ewart-Toland <i>et al.</i> 2005
48 (5.5)	280 (32.0)	547 (62.5)	0.21	0.79	875	0.015	Reino Unido	Fletcher <i>et al.</i> 2006
56 (5.5)	332 (32.3)	639 (62.2)	0.22	0.78	1027	0.017	Estados Unidos	Gu <i>et al.</i> 2007

7.2. Haplótipos de *ERα-397 PvuII - ERα-351 XbaI*

Tabela 17. Frequência dos haplótipos *ERα-397 PvuII - ERα-351 XbaI* neste e em outros estudos

Referências	Origem País		HAPLÓTIPOS								
			n total	PX		Px		pX		Px	
				n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Neste estudo*	Brasil	Brasil	401	53.5	107	14.3	2	0.3	240	32.0	
Van Meurs et al. 2003	África e USA**	USA/Africa Sub-Saharan	19	9	50.0	3	13.6	0	0	7	36.8
Patel et al. 2000	Caucasiana	Canadá	236	35.6	63	9.5	0	0	363	54.9	
Becherini et al. 2000	Caucasiana	Itália	610	249	40.9	35	5.7	8	1.3	318	52.1
Bagger et al. 2000	Caucasiana	Dinamarca	454	153	33.7	60	13.3	0	0	241	53.0
Albagha et. 2001	Caucasiana	Reino Unido	206	69	33.5	19	9.2	2	12.0	116	56.1
Van Meurs et al. 2003	Caucasiana	Holanda	1100	370	33.7	147	13.3	0	0	583	53.0
Jakimiuk et al. 2007	Caucasiana	Polônia	64	12	17.3	15	24.4	7	10.9	30	47.4
Kobayashi et al. 1996	Asiática	Coréia	238	44	18.7	63	26.5	1	0.3	130	54.5
Han et al. 1999	Asiática	Coréia	598	110	18.5	129	21.5	14	2.3	345	57.7
Yamada et al. 2002	Asiática	Coréia	2238	410	18.3	499	22.3	0	0	1329	59.4

* Considerando-se as frequências abaixo:

PX: C-C-G-G (n=87, 11.6%), C-C-G-A (n=57, 7.6%), C-T-G-G (n=3, 0.4%), C-T-G-A (n=254, 33.9%).

Px: C-C-A-A (n=8, 1.1%), C-T-A-A (n=99, 13.2%).

pX: T-T-G-G (n=0, 0%), T-T-G-A (n=2, 0.3%).

px: T-T-A-A (n=240, 32.0%).

** grupo constituído de 10 amostras de indivíduos afro-americanos e nove de indivíduos africanos (sub-Saharanos) todas procedentes do repositório do Instituto Coriell (Camden, NJ, USA).

Tabela 18. Frequência dos haplótipos *ERα-397 PvuII - ERα-397 XbaI* entre brancas (n= 599) e não-brancas (n= 151) na amostra estudada

Haplótipos	Branças n (%)	Não-brancas n (%)
<i>PX</i>: C-C-G-G	70 (11.5)	16 (10.6)
C-C-G-A	45 (7.5)	12 (7.9)
C-T-G-G	3 (0.5)	0
C-T-G-A	208 (34.7)	45 (29.8)
Total:	326 (54.2)	74 (49.0)
<i>Px</i>: C-C-A-A	2 (0.3)	6 (3.9)
C-T-A-A	75 (12.5)	24 (15.9)
Total:	77 (12.8)	30 (19.8)
<i>pX</i>: T-T-G-G	0	0
T-T-G-A	2 (0.3)	0
Total:	2 (0.3)	0
<i>px</i>: T-T-A-A	195 (32.5)	47 (31.1)
Total:	195 (32.5)	47 (31.1)

p-value dos haplótipos entre mulheres brancas e não-brancas = 0.13

7.3. Cálculos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 19. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra total de mulheres do estudo (n= 750)

Polimorfismo Genótipos	n observado (%)	n esperado (%)	
ERα-397 PvuII C/T			
TT	242 (32.3)	$p^*p^*n = 235$	$p=0.560$
CT	356 (47.5)	$2^*p^*q^*n = 370$	$q=0.440$
CC	152 (20.2)	$q^*q^*N = 145$	H-W=1.01
ERα-351 XbaI A/G			
AA	347 (46.3)	$p^*p^*n = 338$	$p=0.670$
AG	313 (41.7)	$2^*p^*q^*n = 331$	$q=0.330$
GG	90 (12)	$q^*q^*N = 81$	H-W=2.21
PR PROGINS			
A1/A1	544 (72.5)	$p^*p^*n = 545$	$p=0.853$
A1/A2	191 (25.5)	$2^*p^*q^*n = 189$	$q=0.147$
A2/A2	15 (2.0)	$q^*q^*N = 16$	H-W=0.14
STK15 F31I			
TT	425 (56.7)	$p^*p^*n = 434$	$p=0.761$
AT	291 (38.8)	$2^*p^*q^*n = 273$	$q=0.239$
AA	34 (4.5)	$q^*q^*N = 43$	H-W=3.23

Tabela 20. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres brancas do estudo (n= 599)

Polimorfismo Genótipos	n observado (%)	n esperado (%)	
ERα-397 PvuII C/T			
TT	195 (32.5)	$p^*p^*n = 191$	$p = 0.564$
CT	286 (47.8)	$2^*p^*q^*n = 294$	$q = 0.436$
CC	118 (19.7)	$q^*q^*n = 114$	H-W= 0.505
ERα-351 XbaI A/G			
AA	270 (45.1)	$p^*p^*n = 264$	$p = 0.663$
AG	255 (42.6)	$2^*p^*q^*n = 267$	$q = 0.337$
GG	74 (12.3)	$q^*q^*n = 68$	H-W= 1.29
PR PROGINS			
A1/A1	428 (71.4)	$p^*p^*n = 429$	$p = 0.846$
A1/A2	158 (26.4)	$2^*p^*q^*n = 156$	$q = 0.154$
A2/A2	13 (2.2)	$q^*q^*n = 14$	H-W= 0.126
STK15 F31I			
TT	340 (56.8)	$p^*p^*n = 349$	$p = 0.763$
AT	234 (39)	$2^*p^*q^*n = 217$	$q = 0.237$
AA	25 (4.2)	$q^*q^*n = 33$	H-W= 3.83

Tabela 21. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres não-brancas do estudo (n= 151)

Polimorfismo Genótipos	n observado (%)	n esperado (%)	
<i>ERα-397 PvuII C/T</i>			
<i>TT</i>	47 (31.1)	$p^*p^*n = 44$	$p = 0.543$
<i>CT</i>	70 (46.4)	$2*p^*q^*n = 75$	$q = 0.457$
<i>CC</i>	34 (22.5)	$q^*q^*n = 32$	H-W= 0.656
<i>ERα-351 XbaI A/G</i>			
<i>AA</i>	77 (51)	$p^*p^*n = 75$	$p = 0.702$
<i>AG</i>	58 (38.4)	$2*p^*q^*n = 63$	$q = 0.298$
<i>GG</i>	16 (10.6)	$q^*q^*n = 13$	H-W= 1.01
<i>PR PROGINS</i>			
<i>A1/A1</i>	116 (76.8)	$p^*p^*n = 116$	$p = 0.878$
<i>A1/A2</i>	33 (21.9)	$2*p^*q^*n = 33$	$q = 0.122$
<i>A2/A2</i>	2 (1.3)	$q^*q^*n = 2$	H-W= 0.04
<i>STK15 F31I</i>			
<i>TT</i>	85 (56.3)	$p^*p^*n = 85$	$p = 0.751$
<i>AT</i>	57 (37.8)	$2*p^*q^*n = 57$	$q = 0.259$
<i>AA</i>	9 (5.9)	$q^*q^*n = 9$	H-W= 0.02

7.4. Protocolo de extração de DNA

Extração de DNA pelo Método de Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, EUA)

Solução de Lise de Hemácias (RBC) 5 mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂)
1 mM EDTA pH 8,0

Solução de Lise Celular (CLS) 10 mM Tampão Tris pH 7,5
1 mM EDTA pH 8,0
1% SDS

Solução de Precipitação de Proteína 7,5 M Acetato de amônio (NH₄Ac)

Outros Agentes Utilizados Isopropanol 100%
Etanol 70%
Tampão TE 1X

RBC 0,5 ml MgCl₂ 1 M
0,2 ml EDTA 0,5 M
100 ml água destilada

CLS 1 ml Tris 1 M
0,2 ml EDTA 0,5 M
10 ml SDS 10%
100 ml H₂O destilada

Etapa 1 – Lise Celular

- Adicionar 3 ml de sangue total a um tubo *falcon* de 15 ml contendo 9 ml da solução de lise RBC. Inverter o tubo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Inverter pelo menos uma vez mais durante a incubação;
- Centrifugar por 10 minutos a 3400 rpm (2000g). Remover o sobrenadante deixando um pellet visível de células brancas e 100-200 ul de líquido residual;
- Vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas no supernadante residual, o que facilita em muito a lise na etapa seguinte;
- Adicionar 3 ml da solução de lise celular ao tubo contendo as células ressuspensas e misturar com pipeta de transferência diversas vezes até a solução ficar homogênea. Após misturar, nenhum resíduo celular (ou aglomerado de células) deve ser visível. Se houverem resíduos, incubar a 37°C até a solução ficar homogênea. A amostra é estável se armazenada nessa solução a temperatura ambiente por 18 meses;

Etapa 2 – Precipitação da Proteína

- a) Resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
- b) Adicionar 1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
- c) Vortexar vigorosamente por 20 segundos para misturar a solução uniformemente com o lisado celular;
- d) Centrifugar a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um pellet marrom escuro e compacto;

Etapa 3 – Precipitação do DNA

- a) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo falcon de 15 ml contendo 3 ml de isopropanol 100%;
- b) Inverter o tubo lentamente cerca de 50 vezes até que apareçam os “novelos” de DNA;
- c) Centrifugar a 3400 rpm por 3 minutos, o DNA será visível como um pellet branco pequeno;
- d) Retirar o sobrenadante e drenar o tubo em papel absorvente. Adicionar 3 ml de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA;
- e) Centrifugar a 3400 rpm por 1 minuto. Retirar o sobrenadante cuidadosamente. O pellet poderá estar solto, por isso é preciso inverter o tubo lenta e cuidadosamente para não perdê-lo;
- f) Drenar o tubo em papel absorvente e deixar a amostra “secar” a temperatura ambiente por 15 minutos;

Etapa 4 – Hidratação do DNA

- a) Adicionar 200-250 μ l de tampão TE 1X que resulta em uma concentração aproximada de 400 μ g/ μ l. Deixar o DNA hidratar neste tampão a temperatura ambiente por 12-24 horas ou alternativamente, incubar o DNA a 65° C por 1 hora;
- b) Armazenar o DNA a 2-8° C;

7.5. Protocolo de PCR do Polimorfismo *PROGINS* do Receptor de Progesterona

Tabela 22. Componentes para a reação de PCR do polimorfismo *PROGINS*

Componente	Concentração Estoque	Concentração final	Volume por reação (µl)
Água	Qsp	qsp	10.5
Tampão	10X	1X	2.0
MgCl ₂	50 mM	1.6 mM	0.8
dNTP	2 mM	0.04 mM	0.5
Primer Forward	20 pmol	0.4 pmol	0.5
Primer Reverse	20 pmol	0.4 pmol	0.5
Taq platinum	5 unidades/ µl	1 unidade	0.2
DNA	20 ng/µl	100 ng/µl	5.0
Total	---	---	25

Programa para o PCR no Termociclador Eppendorf Mastercycler:

- a) 94°C 3 minutos
 - b) 94°C 30 segundos
 - c) 60°C 1 minuto
 - d) 72°C 30 segundos
- do passo *b* até passo *d* – 35 ciclos
- e) 72°C 5 minutos

Gel de agarose (2%):

- 2 g agarose
- 7 µl brometo de etídio (1 µg/ml)
- 100 ml tampão TBE 1X

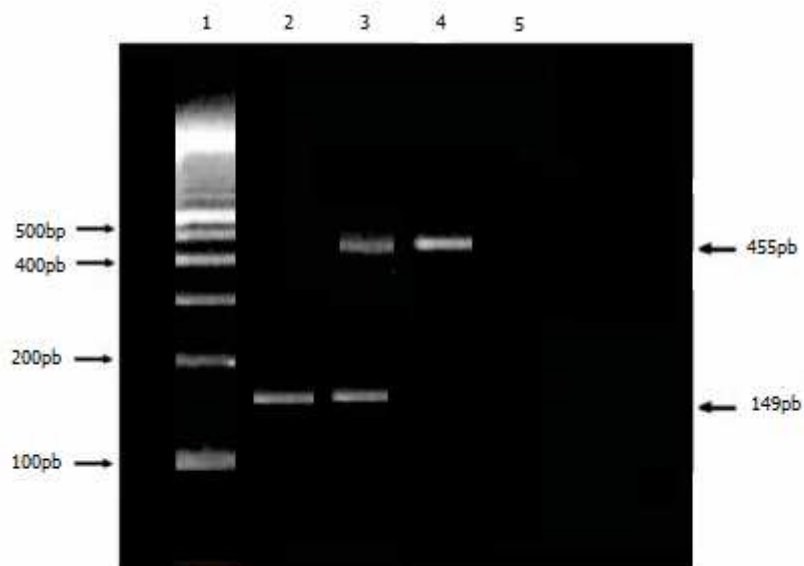


Figura 4. Imagem obtida sob visualização em transiluminador de gel de agarose impregnado com brometo de etídio e contendo amostras com diferentes genótipos para o polimorfismo *PROGINS* (gene *PR*). Coluna 1: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA); coluna 2: genótipo *A1/A1* (produtos de amplificação de 149 pb); coluna 3: genótipo *A1/A2* (produtos de amplificação de 149 e 455 pb); coluna 4: genótipo *A2/A2* (produtos de amplificação de 455 pb) e coluna 5: “branco” do experimento.

7.6. Protocolo de PCR dos Polimorfismos *ERα-397 PvuII C/T*, *ERα-351 XbaI A/G* e *STK15 F31I*

Tabela 23. Componentes para a reação de PCR em tempo real

Componente	Concentração estoque	Concentração Final	Volume por reação (µl)
Água	qsp	qsp	4.94
TaqMan Universal PCR Master Mix	2X	2X	6.25
SNP Genotyping Assay Mix	20X	20X	0.312
DNA	20ng/µl	20ng/µl	1
Total			12.5

Programa para o PCR em Tempo Real – Termociclador Applied Biosystems 7500:

- a) 95°C 10 minutos
- b) 92°C 15 segundos
- c) 60°C 60 segundos

Após PCR, a fluorescência é medida no mesmo aparelho e realizada a discriminação alélica.

7.7. Seqüências das sondas utilizadas para análise dos polimorfismos analisados por PCR Tempo Real

7.7.1. Polimorfismo *ER α -397 PvuII C/T*:

(dbSNP ID: rs2234693 e Assay ID: C__3163590_10):

[VIC/FAM]

TCATCTGAGTTCCAAATGTCCCAGC[C/T]GTTTTATGCTTTGTCTCTGTTTCCC

7.7.2. Polimorfismo *ER α -351 XbaI A/G*:

(dbSNP ID: rs9340799 e Assay ID: C___3163591_10):

[VIC/FAM]

TTCCCAGAGACCCTGAGTGTGGTCT[A/G]GAGTTGGGATGAGCATTGGTCTCTA

7.7.3. Polimorfismo *STK15 F31I*:

(dbSNP ID: rs2273535 e Assay ID: C___25623289_10)

[VIC/FAM]

AAAACGTGTTCTCGTGACTCAGCAA[A/T]TTCCTTGTCAGAATCCATTACCTGT

7.8. Gráficos de discriminação alélica e amplificação dos polimorfismos analisados em PCR Tempo Real

7.8.1. Polimorfismo *ERα-397 PvuII C/T*

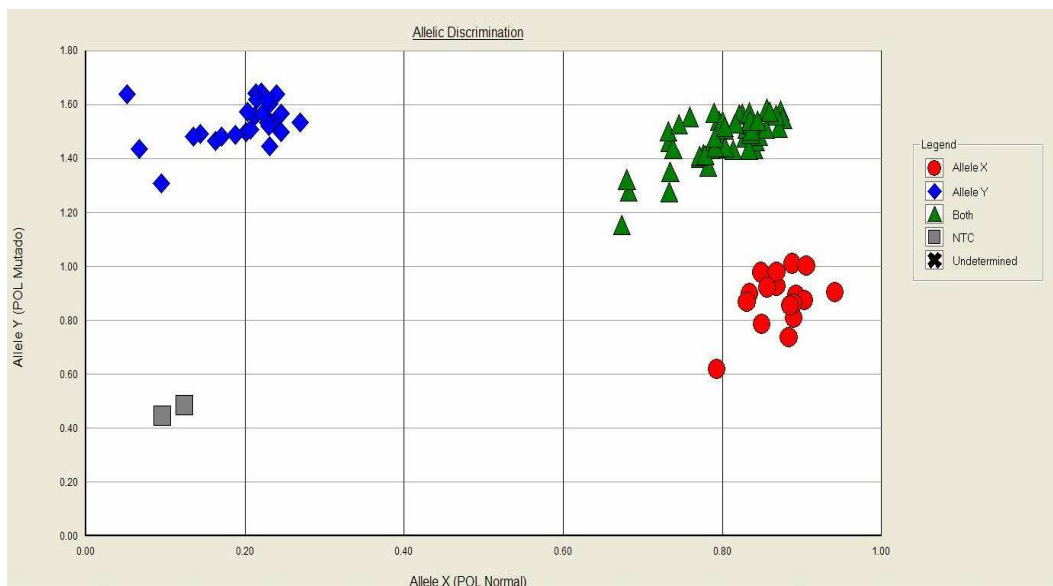


Gráfico 1. Discriminação alélica do polimorfismo *ERα-397 PvuII C/T*. Observa-se em azul (diamante) amostras com o genótipo TT, em verde (triângulo) amostras com o genótipo CT, em vermelho (esfera) amostras com o genótipo CC. Em cinza (quadrado) estão denotados os “brancos” do experimento.

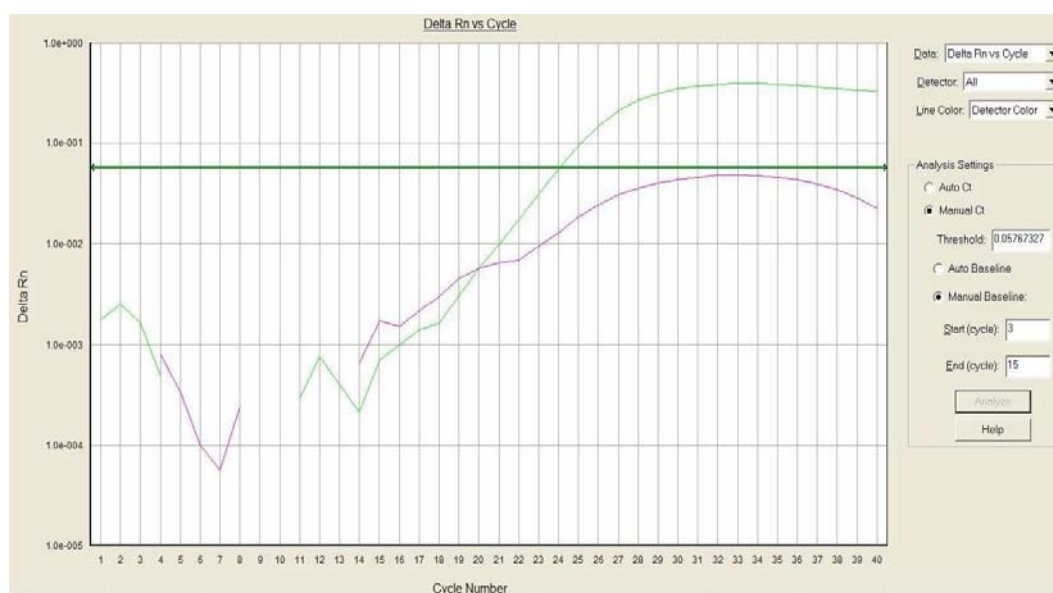


Gráfico 2. Amplificação de uma amostra (genótipo CC do polimorfismo *ERα-397 PvuII*) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC.

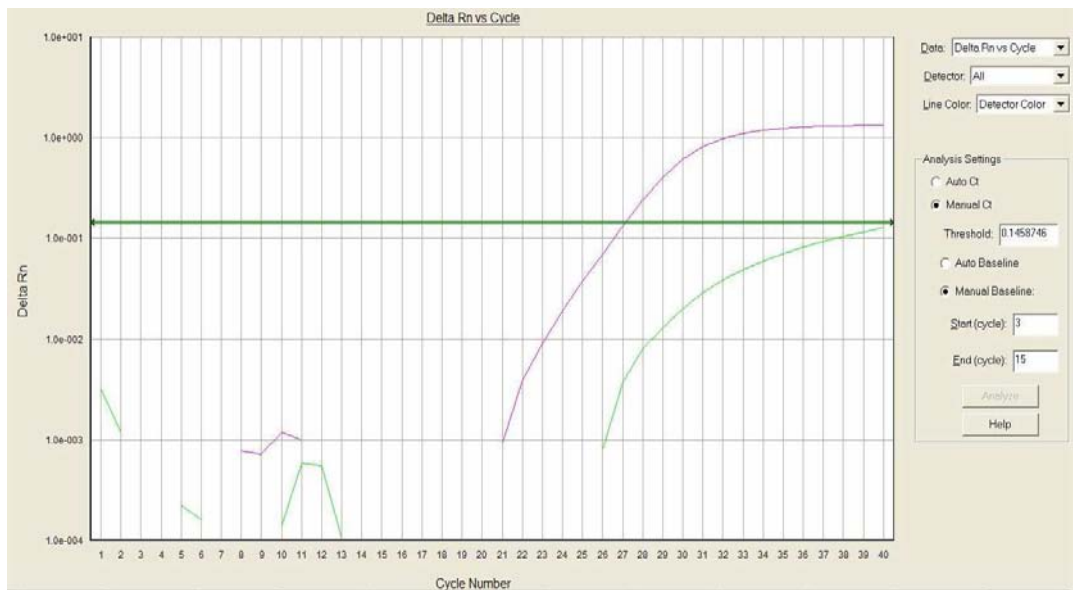


Gráfico 3. Amplificação de uma amostra (genótipo *TT* do polimorfismo *ERα-397 PvuII*) em que houve anelamento da sonda marcada com FAM.

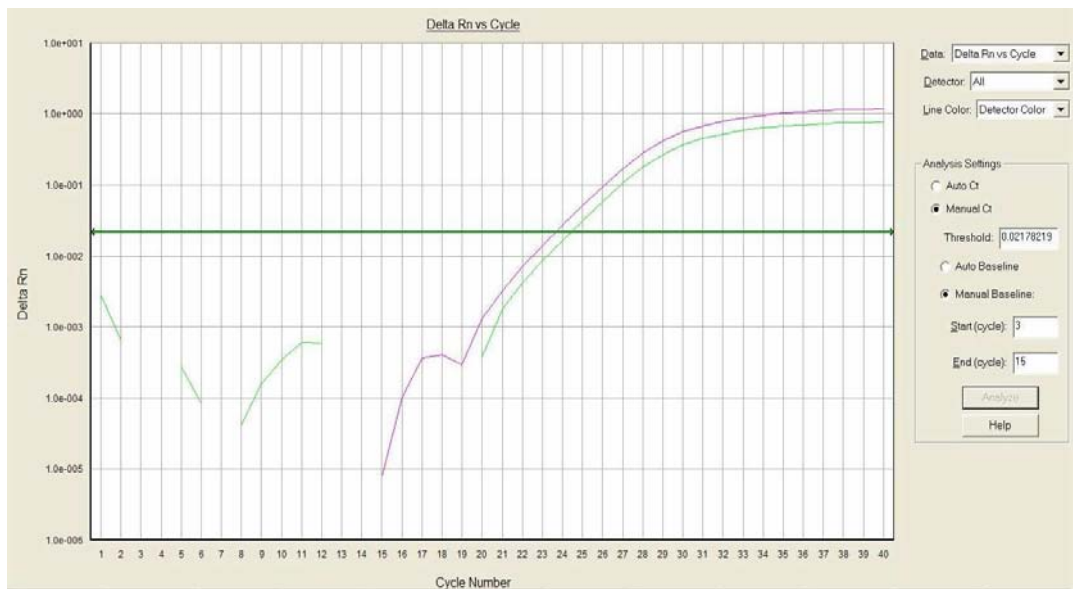


Gráfico 4. Amplificação de uma amostra (genótipo *CT* do polimorfismo *ERα-397 PvuII*) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM.

7.8.2. Polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G*

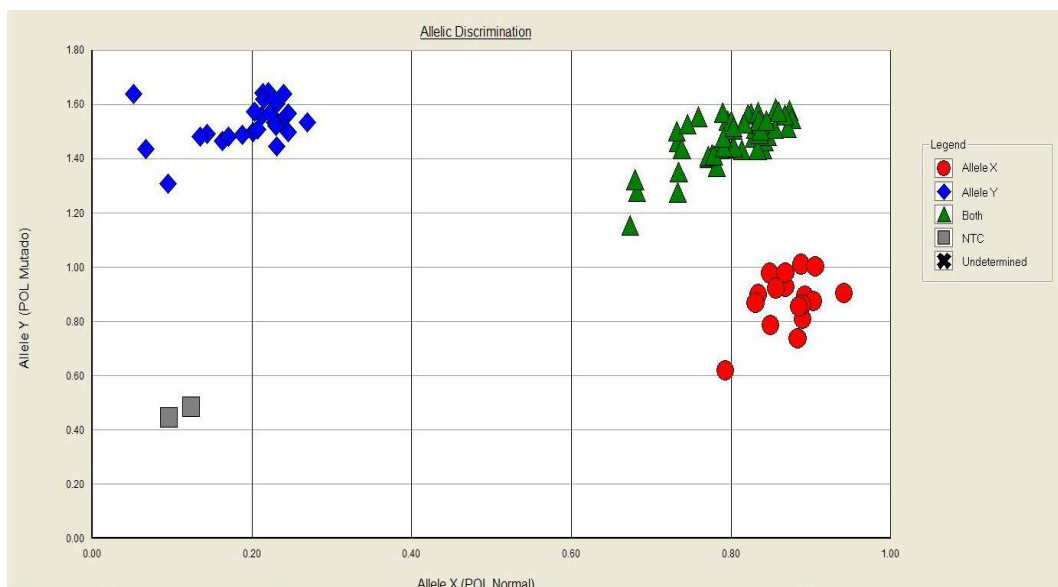


Gráfico 5. Discriminação alélica do polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G*. Observa-se em azul (diamante) amostras com o genótipo GG, em verde (triângulo) amostras com o genótipo AG, em vermelho (esfera) amostras com o genótipo AA. Em cinza (quadrado) estão denotados os “brancos” do experimento.



Gráfico 6. Amplificação de uma amostra (genótipo AA do polimorfismo *ERα-351 XbaI A/G*) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC.

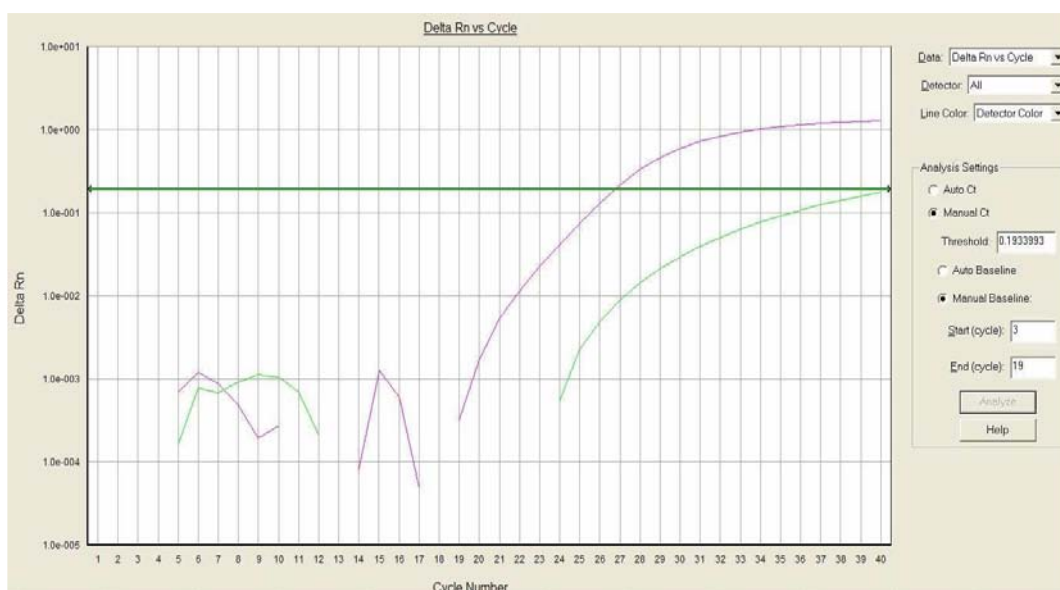


Gráfico 7. Amplificação de uma amostra (genótipo GG do polimorfismo *ERα*-351 *Xba*I A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com FAM.

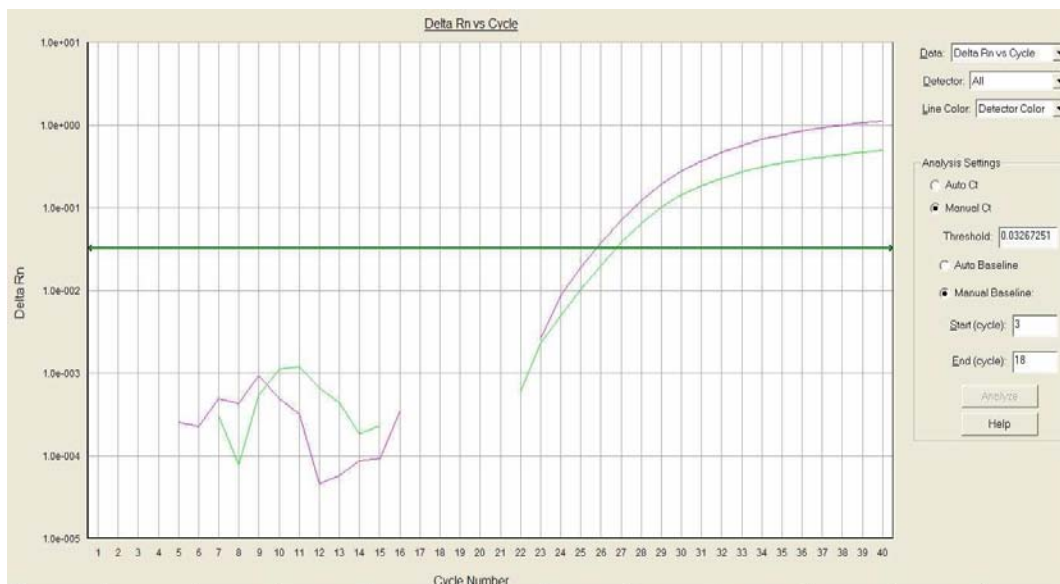


Gráfico 8. Amplificação de uma amostra (genótipo AG do polimorfismo *ERα*-351 *Xba*I A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM.

7.8.3. Polimorfismo *STK15 F31I*

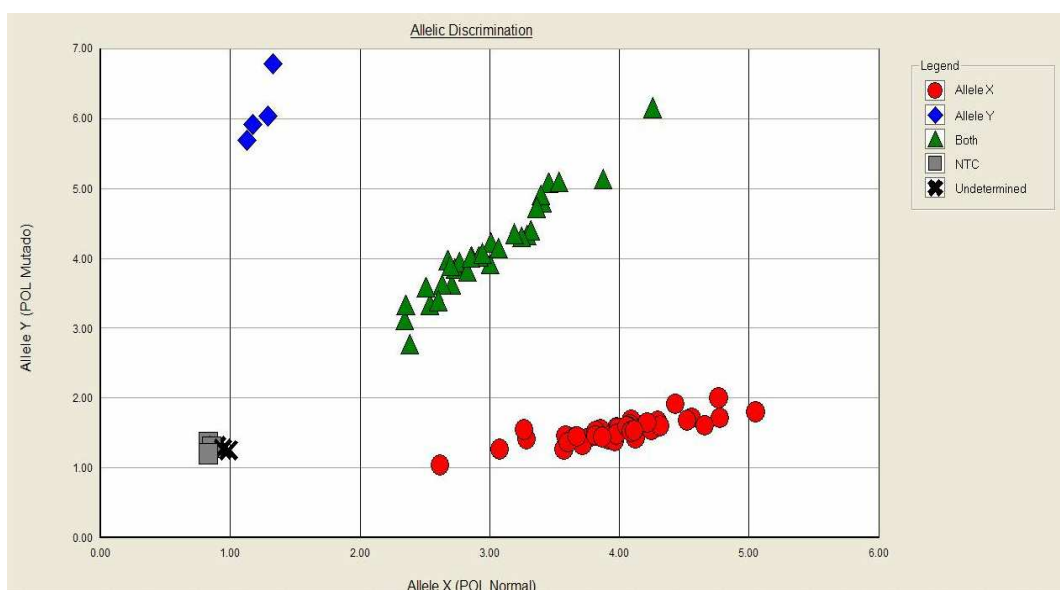


Gráfico 9. Discriminação alélica do polimorfismo *STK15 F31I*. Observa-se em azul (diamante) amostras com o genótipo AA, em verde (triângulo) amostras com o genótipo AT, em vermelho (esfera) amostras com o genótipo TT. Em cinza (quadrado) estão denotados os “brancos” do experimento e as amostras “X” correspondem a falhas de amplificação.

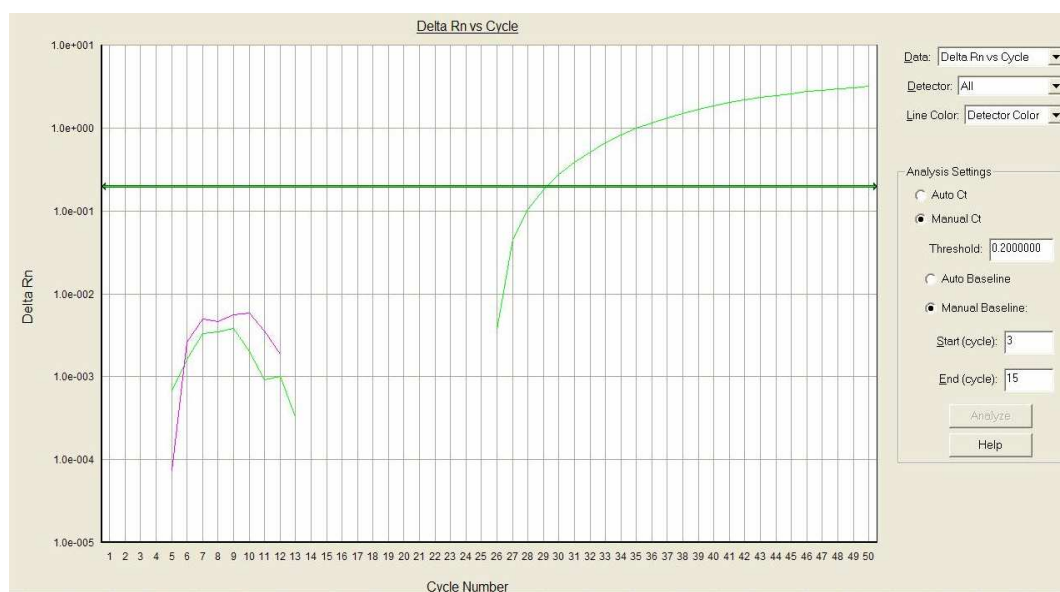


Gráfico 10. Amplificação de uma amostra (genótipo TT do polimorfismo *STK15 F31I* em que houve anelamento da sonda marcada com VIC.

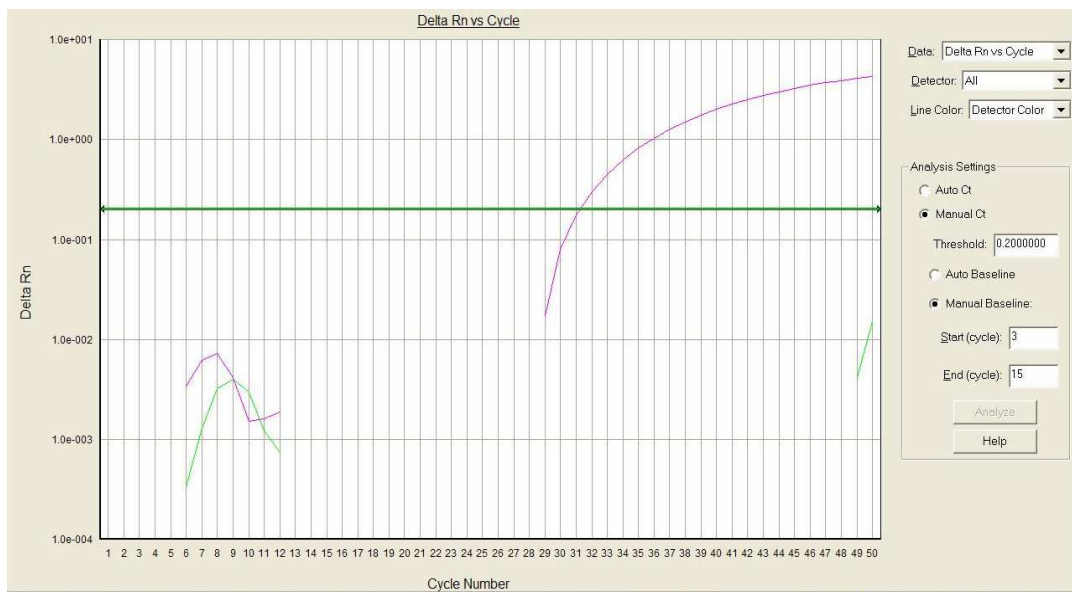


Gráfico 11. Amplificação de uma amostra (genótipo AA do polimorfismo STK15 F31I em que houve anelamento da sonda marcada com FAM.



Gráfico 12. Amplificação de uma amostra (genótipo TT do polimorfismo STK15 F31I em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM.

7.9. Carta de Aprovação do Projeto no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 05-182

Versão do Projeto: 15/08/2005

Versão do TCLE: 29/08/2005

Pesquisadores:

LAVÍNIA SCHULER-FACCINI

PATRICIA ASHTON PROLLA

EDENIR INEZ PALMERO

ROBERTO GIUGLIANI

LUCIANE KALAKUN

MAIRA CALEFFI

Título: ESTUDO SOBRE O PERFIL DE RISCO E A FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA NA COMUNIDADE DA ILHA DOS MARINHEIROS EM PORTO ALEGRE

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular Nº 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 29 de agosto de 2005.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

7.10. Carta de Aprovação do Projeto no Instituto de Educação de Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento

Hospital Moinhos de Vento
Comitê de Ética em Pesquisa
Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: Estudo sobre o perfil de risco e a frequência de polimorfismos genéticos associados ao Câncer de mama em um grupo de mulheres de POA

Pesquisador Responsável Patricia Ashton Prolla

Data da Versão
11/10/2005

Cadastro HVM 2005/55

Data do Parecer 24/10/2005

Grupo e Área Temática I.1 Genética Humana

Objetivos do Projeto

Caracterizar um grupo de mulheres de 40 a 69 anos, sem história pessoal de câncer de mama, residentes em Porto Alegre quanto a fatores de risco genéticos colhidos a partir de heredograma, caracterizar a população estudada quanto a fatores de risco não genéticos, quanto a polimorfismos e comparar as frequência gênicas e genótípicas das variações obtidas no estudo com as já descritas na literatura.

Sumário do Projeto

O câncer de mama é um problema significativo de saúde pública, devido à sua morbidade, altas taxas de incidência e de mortalidade, sendo POA a cidade com as mais altas taxas. O conhecimento acerca de alterações em genes de suscetibilidade é relevante para determinar fatores etiológicos e direcionar estratégias de prevenção. Diante dos objetivos já mencionados, o projeto realizar-se-á no Núcleo Mama com cerca de 800 mulheres de 40 a 69 anos sem história desta patologia.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em material biológico
Delimitação	Adequado
Tamanho de amostra	Total 800 No HVM
Cálculo do tamanho da amostra	Não informado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crterios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/2006
Data de término prevista	1/2/2007
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Outras fontes
Referências Bibliográficas	Adequadas

**Hospital Moinhos de Vento
Comitê de Ética em Pesquisa
Parecer Consubstanciado de Projeto**

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais e Sugestões

O presente projeto realizar-se-á com um grupo de mulheres provenientes do Núcleo Mama, com financiamento solicitado ao FINE e CNPq. Apenas não foi demonstrado o cálculo de tamanho do amostra, o qual sugiro ser entregue.

7.11. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Estudo sobre o perfil de risco e a frequência de polimorfismos genéticos associados ao câncer de mama em um grupo de mulheres de Porto Alegre”

Justificativa e os Objetivos da pesquisa:

O câncer de mama acomete, ao longo de toda vida, cerca de uma em cada dez mulheres em nosso meio e sua detecção precoce é muito importante, pois aumenta as chances de cura da doença. Atualmente acredita-se que características genéticas individuais (chamadas polimorfismos em genes de suscetibilidade) podem aumentar ou diminuir a chance de uma pessoa ter câncer de mama independente de outros fatores de risco, como por exemplo, história de câncer na família e uso de hormônios. O conhecimento do perfil e da distribuição desses polimorfismos em nosso meio poderá auxiliar o entendimento de fatores de risco e causas do câncer de mama (ambientais ou não). Este é um estudo de pesquisa que será feito em mulheres de 40 a 69 anos que realizam mamografias todos os anos no Núcleo Mama Porto Alegre. Ele tem como objetivo avaliar se há nessas mulheres fatores de risco para o câncer de mama, e se esses fatores são comuns ou não. Dentre os fatores de risco estão também certas características genéticas (chamados polimorfismos) que podem ou não aumentar levemente o risco para câncer de mama. Inicialmente serão estudados polimorfismos em algumas regiões do material genético. Ao longo do estudo, novas informações poderão surgir e a análise de novos polimorfismos associados ao risco para câncer de mama poderá ser realizada.

Procedimentos e Riscos ou desconfortos potenciais:

Informações sobre fatores de risco para o câncer de mama serão obtidas de um questionário de risco e do seu prontuário ambos existentes no Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). Estas informações terão sido colhidas no momento de entrada em outro estudo, de acompanhamento anual por mamografia no NMPOA. Para estudar as características genéticas (ou polimorfismos) será coletada uma pequena amostra de seu sangue (10 ml) em dois frascos. As amostras serão analisadas no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas pelo pessoal especialmente treinado para este fim o que diminui as chances de complicações.

Benefícios esperados:

Nós ainda não sabemos se estes “polimorfismos genéticos” realmente tem alguma importância sobre o risco de câncer de mama em mulheres do Rio Grande do Sul, e este estudo está sendo feito justamente para tentar verificar isso. Este trabalho poderá ou não beneficiar sua família futuramente. Esse benefício provavelmente não será direto para sua pessoa, pois é um estudo inicial cujos resultados deverão ser confirmados posteriormente em uma análise em muitas mulheres adicionais, por um número maior de anos. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para você e sua família todo esforço será realizado para informá-los. Como ainda não sabemos exatamente o que significa ter cada um destes polimorfismos em termos de risco para câncer de mama, é importante que você continue realizando todos os exames de rotina para manter a saúde das suas mamas, como auto-exame mensal das mamas, exame anual por médico no posto e mamografia anual a partir dos 40 anos de idade, mesmo que você não sinta nada de diferente nas suas mamas.

Você tem o direito de recusar-se a participar deste projeto e sua recusa não afetará de nenhuma maneira o seu cuidado (ou de seus familiares) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou no NMPOA.

Pesquisadoras responsáveis: Dras. Lavinia Schüler-Faccini e Patrícia Ashton-Prolla
Telefone: (051) 2101-8011

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
05.10.106
WR 05182

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informada, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM **NÃO**

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade de meu tratamento.

SIM **NÃO**

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.

SIM **NÃO**

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

SIM **NÃO**

5. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização futura.

SIM **NÃO**

6. Autorizo a utilização de minha amostra de DNA caso surjam novos estudos sobre polimorfismos relacionados ao câncer de mama no futuro.

SIM **NÃO**

7. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível.

SIM **NÃO**

8. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

SIM **NÃO**

9. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.

10. Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do entrevistador

Nome por extenso

Local e Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Nome e assinatura do participante

Local e Data

Data de nascimento

Pesquisadoras responsáveis: Dras. Lavinia Schüler-Faccini e Patrícia Ashton-Prolla
Telefone: (051) 2101-8011

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

05.01.1.06
WY 05182

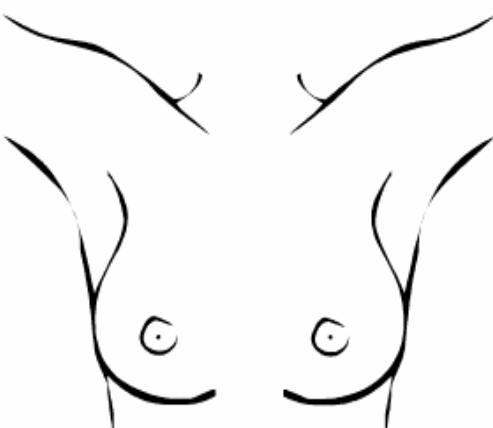

7.12. Ficha de Levantamento de Dados do Núcleo Mama Porto Alegre

NÚCLEO MAMA PORTO ALEGRE						
FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS						
Nome:		DN:		Idade:		
Endereço:		No:		Compl.:		
Bairro:		Fone:				
Escolaridade:		UBS:		Data da Consulta:		
1. Algum de seus parentes de 1o grau teve câncer? (pais, irmãos ou filhos)				sim	não	não sei
Se positivo informe: Familiar:		Tipo:		Idade:		
Se positivo informe: Familiar:		Tipo:		Idade:		
RISCO TIPO I - HISTÓRIA FAMILIAR				sim	não	não sei
2. Algum de seus parentes de 1o grau tem ou teve câncer de mama e/ou ovário?						
3. Alguém na sua família tem ou teve câncer nas duas mamas?						
4. Algum homem da sua família teve câncer de mama?						
5. Alguma mulher na sua família teve câncer de mama E ovário (a mesma pessoa)?						
6. Alguma mulher na sua família teve câncer de mama antes dos 50 anos?						
7. Na sua família, há 2 ou mais pessoas com câncer de mama e/ou ovário ?						
8. Na sua família, há 2 ou mais pessoas com câncer de mama e/ou intestino ?						
RISCO TIPO II - AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA				RISCO TIPO III - FUMO		
9. Peso (kg):				12. Tem hábito de fumar?		não
10. Altura (m):				13. Quantos cigarros/dia:		
11. IMC (peso/altura ²):						
RISCO TIPO IV - USO DE BEBIDA ALCOÓLICA				sim	não	
14. Tem hábito de ingerir bebida alcoólica?				1 medida = vinho: 2 copos		
15. Quantas medidas por dia?				cerveja: 1 garrafa ou 2 latas		
				destilados: 2 doses		
RISCO TIPO V - ANTECEDENTES				sim	não	não sei
16. Você já teve câncer de mama ou ovário?						
17. Você já fez biópsia de mama?						
18. Houve alteração na sua biópsia?						
19. No de biópsias realizadas:						
EXAME CLÍNICO						
Normal						
Alterado						
		Nódulo	Derr. papilar	Alt. Pele	Gânglios	Outro. Qual?
ENCAMINHAMENTOS						
RISCO I	SIM	1 resposta positiva ==> NMPOA				
RISCO II	SIM	IMC > 25				
RISCO III	SIM	Se fumar				
RISCO IV	SIM	7 ou mais medidas/semana				
RISCO V	SIM	1 resposta positiva ==> NMPOA				
EXAME CLÍNICO	ALTERADO	alterado ==> NMPOA				
OBSERVAÇÕES FINAIS						
a) Acompanhamento Anual (sem fatores de risco de 15 a 39 anos ou >70 anos)						
b) Rastreamento mamográfico anual (40-69 anos)						
c) Sintomático						
Data do Encaminhamento:						
Profissional:						
Registro:						

7.13. Ficha de Anamnese do Núcleo Mama Porto Alegre

Identificação:	
Registro: _____	
Endereço: _____	
Nome: _____	
Nome da Mãe: _____	
Data de Nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: ____ Raça () branca () negra () asiática	
<input type="checkbox"/> Consulta de Rotina Data da 1ª consulta: ____ / ____ / ____	
História Atual	
Queixa Principal	Observações
<input type="checkbox"/> Nenhuma	
<input type="checkbox"/> Dor mamária	
<input type="checkbox"/> Nódulo	
<input type="checkbox"/> Derrame papilar	
<input type="checkbox"/> Alteração de imagem	
<input type="checkbox"/> Alteração de pele	
<input type="checkbox"/> Abscesso mamário	
<input type="checkbox"/> Outro	
<input type="checkbox"/> Câncer mamário	
Cirurgia: _____	
T ____ N ____ M ____ E: _____ Data: ____ / ____ / ____	
Anatomopatológico: _____	
Exames Apresentados	
<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
História Gineco Obstétrica	
Menstruação	
Menarca: ____ anos	
Gestações	
Nascimento do 1º filho : ____ anos	
Nº gestações: ____ Parto Normal ____ Cesárea ____ Abortos ____ Mola ____	
Última gestação: ____ anos	
Amamentação ____ meses	

Cirurgias			
<input type="checkbox"/> Histerectomia		Idade: ____ anos	
<input type="checkbox"/> Ooforectomia		<input type="checkbox"/> Uni <input type="checkbox"/> Bi	
		Idade: ____ anos	
Menopausa			
Idade: ____		<input type="checkbox"/> Natural <input type="checkbox"/> Cirúrgica	
Reposição Hormonal			
<input type="checkbox"/> Em uso		Nº de meses ____	
Qual? _____		<input type="checkbox"/> Estrógeno <input type="checkbox"/> Contínuo <input type="checkbox"/> Seqüencial <input type="checkbox"/> Progesterona <input type="checkbox"/> Contínuo <input type="checkbox"/> Seqüencial	
Contraceção/ Método			
Outras doenças			
<input type="checkbox"/> Mama			
Já fez biopsia mama			
() sim			
() não			
() não sei			
Quantas vezes ? _____ -Realiza auto exames da mama . _____			
<input type="checkbox"/> Endométrio			
<input type="checkbox"/> Ovário			
<input type="checkbox"/> Colo do Útero			
Sexualmente Transmissíveis			
<input type="checkbox"/> HIV			
<input type="checkbox"/> HPV (Verrugas)			
<input type="checkbox"/> Outros _____			
Revisão de sistemas			
Doenças:			
Cirurgia Prévias :			
Alergias:			
História Familiar			
Algum de seus parentes de 1º grau tem ou teve câncer ? (pai , mãe , irmã , filho ou filha)			
Se a resposta for sim Indique : Familiar _____ Tipo: _____ Idade de início: _____			
Algum de seus parentes de 1º grau tem ou teve câncer de mama ou ovário? () sim () não () não sei			
Alguém na sua família tem ou teve câncer nas duas mamas ? () sim () não () não sei			
Algum homem da sua família teve câncer de mama? () sim () não () não sei			
Alguma mulher em sua família teve câncer de mama e ovário () sim () não () não sei			
Alguma mulher em sua família teve câncer de mama antes dos 50 ? () sim () não () não sei			
Na sua família , há duas (ou mais) pessoas com câncer de mama e/ou câncer de ovário? () sim () não () não sei			
Na sua família , há duas (ou mais) pessoas com câncer de mama e/ou intestino ? () sim () não () não sei			
Encaminhar ao geneticista se ao menos uma das respostas for "sim"			
Perfil Psicosocial			
Situação	Início	Término	Observações

<input type="checkbox"/> Uso de álcool			01 medida = 02 copos de vinho 01 medida= 01 garrafa de cerveja ou 02 latas 01 medida = 02 doses de destilado - fator de risco se o individuo utilizar 07 ou mais medidas por semana	
<input type="checkbox"/> Uso de fumo			Quantos /dia : tipo:	
<input type="checkbox"/> Uso de drogas				
<input type="checkbox"/> Obesidade			Altura : Peso : IMC : peso/alturaxaltura	
<input type="checkbox"/> Depressão				
<input type="checkbox"/> Outros				
Situação familiar				
Exame da Mama				
	LEGENDA	<i>QII - Quadrante Interno Inferior</i> <i>QIS - Quadrante Interno Superior</i> <i>QEI - Quadrante Externo Inferior</i> <i>QES - Quadrante Externo Superior</i> <i>MAM - Mamilo</i> <i>ME - Mama Esquerda</i> <i>MD- Mama Direita</i>	Tipo 	Lesão <i>Nódulo</i> <i>Nodularidade</i> <i>Retração</i> <i>Pele alterada</i>
		Região	Tipo	Dimensões
CONDUTA PROPOSTA:				
ENCAMINHAMENTO:				
EVOLUÇÃO:				
DATA:				
DATA:				

7.14. Artigo submetido a Revista “*Genetics and Molecular Biology*”

Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in Southern Brazil.

Edenir I. Palmero PhD^{a,b}, Maira Caleffi MD,PhD^c, Lavínia Schüler-Faccini MD,PhD^{a,d,e}, Fernanda L. Roth MD^f, Luciane Kalakun RN, MSc^g, Giovana Skonieski RN^c, Juliana Giacomazzi^{b,f}, Roberto Giugliani MD, PhD^{a,d,e}, Bernardete Weber^c, Suzi A. Comey PhD^h, Patricia Ashton-Prolla MD, PhD^{* a,b,d-f}

Author's affiliations:

- (a) Post-Graduate Course in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.
- (b) Genomic Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.
- (c) Núcleo Mama Porto Alegre and Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Brazil
- (d) Medical Genetics Service, HCPA, Brazil.
- (e) Department of Genetics, UFRGS, Brazil
- (f) Post-Graduate Course in Medicine, UFRGS, Brazil.
- (g) Post-Graduate Course in Epidemiology, UFRGS, Brazil.
- (h) Department of Statistics, Mathematics Institute, UFRGS, Brazil.

Short title: Genetic cancer risk assessment in Southern Brazil.

Category: Original article

Authors key words: Hereditary cancer syndromes, breast cancer, genetic counseling.

Total number of counts of each: (1) authors: 11; (2) text files: 1; (3) table files 2; (4) figures and illustrations: 1 figure; (5) permissions accompanying cover letter: not applicable

CORRESPONDING AUTHOR:

Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD
Departamento de Genética – UFRGS e
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
90035-903 Porto Alegre RS
Brazil
e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br
Tel.: + 55 51 2101-8011
Fax: + 55 51 2101-8010

ABSTRACT

Background: In April of 2004, a large population-based cohort study (the Núcleo Mama Porto Alegre – NMAMA Cohort) was started in Porto Alegre, Southern Brazil, an area with one of the higher breast cancer incidence and mortality rates of the country. The goals of the study were to determine the prevalence of hereditary breast cancer phenotypes in the sample as well as evaluate the acceptance and participation of individuals with a family history of cancer in a genetic cancer risk assessment program (GCRA). **Methods:** At inclusion in the cohort, all patients answered a questionnaire about family history, designed to identify patients with an increased likelihood of carrying germline mutations in *BRCA* and other breast cancer predisposition genes. Patients with a positive family history were referred to GCRA, where a full pedigree was obtained and lifetime breast cancer risk estimates and as well as prior probabilities of carrying a *BRCA* mutation were estimated whenever applicable and fulfilment of criteria for a breast cancer predisposition syndrome was evaluated independently by two clinical geneticists. **Results:** Of the 9218 women enrolled in the NMAMA cohort, 1286 (13.9%) reported a family history of cancer and 1247 were referred to GCRA; 345 (27.7%) of these did not reach or declined such evaluation. Of the remaining 902 women, 55 (8.0%) had an estimated lifetime risk of developing breast cancer $\geq 20\%$ and 214 (23.7%) had pedigrees suggestive of a breast cancer predisposition syndrome; an unexpected high number of families with criteria for Li-Fraumeni-like syndrome were identified. Women at higher risk categories were offered genetic testing and referred to more intensive follow-up and/or screening protocols. **Conclusions:** The overall prevalence of a hereditary breast cancer phenotype was 2.3% in the population-based sample of women studied. This indicates that in a considerable proportion of women from this

community, further genetic evaluation of the patient and her family genetic testing should be undertaken, exposing a problem of significant magnitude. The large proportion of GCRA attenders (72.3%), suggests that the program was well accepted by the community and is feasible, regardless of potential cultural, economic and social barriers.

Condensed abstract: The study describes the implementation and preliminary results of a genetic cancer risk assessment program in an underserved community in Southern Brazil. A significant proportion of the women from the general population of that community reported a family history consistent with hereditary breast cancer syndrome phenotypes. The program was well accepted by the community and is feasible, regardless of potential cultural, economic and social barriers.

Acknowledgements and sources of support: The Núcleo Mama (NMAMA) Cohort, from which the patients derive, is maintained by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency from Porto Alegre. The authors are indebted to Karen Barboza de Pereira, Diego Pasetto, Cristina Brinkmann de Oliveira Netto, Ana Cecília Mano de Azevedo, Ademar Bedin Júnior, Luciane Poletto Antunes, Juliana Zignani, Flávio Marcel Telis Gonzalez, Luciano Artico, Patricia Izetti Lisbôa Ribeiro, Ernestina Aguiar, Érica Batassini, Susana Mayer Moreira, Vanessa Belo Reyes and the NMPOA team for their help with the recruitment, evaluation and follow-up of the patients included in this study. We also wish to thank Drs. Juan Clinton Llerena Jr, Pierre Hainaut, Victor Penchaszadeh, Maria Isabel Waddington Achatz, Philip Kivitz and C. Kent Osborne for their stimulating discussions about the design and implementation of this program. This study was supported by a grant from Susan G.

Komen for the Cure (POP0403033), and in part by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa –FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (# 04-170) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PRODOC grant number 00202/03-7). El Palmero was supported in part by grants from The International Agency for Research in Cancer (IARC) and CNPq (process number 203732/2005-7).

INTRODUCTION

Latin America is formed by medium-to-low income countries with evolving health indicators towards patterns seen in developed nations. The population has an extensive ethnic and cultural diversity, determined by their history and different degrees of admixture between native and immigrant populations [1]. Brazil is the largest and most populated country in Latin America, it has approximately 170 million inhabitants, and although its gross national product is ranked as world's 8th, the average per capita income is world's 39th [2, 3]. A significant challenge in Brazil and other Latin American countries is the inclusion of new health technologies, including genetic risk assessment and testing, in a health care system that has significant budget constraints.

The Brazilian constitution guarantees the right to medical assistance to every citizen and at least 75% of the population depends almost entirely on health care provided by the government (SUS - *Sistema Único de Saúde*). A special program of SUS designed for community-based health care is the *Programa Saúde da Família* (PSF or Family Health Program), created in the mid-90's and based upon multidisciplinary teams, composed by a physician, nurse, one or two nurse assistants and 4-6 lay community health workers. This team provides primary health care to a

geographically defined group of approximately 600 families. PSF has expanded rapidly and nowadays provides health care to about half of the population [4-7].

With few exceptions, departments of health at city, provincial and national levels do not have explicit policies for the prevention and care of people with genetic disorders in Brazil. Genetic services are mainly centered in teaching hospitals of major cities and cancer genetic testing *per se* is not yet covered by SUS or private health insurance. In Porto Alegre, the two existing public GCRA services are located in tertiary care centers [8-10].

Breast cancer (BC) is a significant public health problem in all Brazilian States, and is currently the first cause of cancer-related deaths in Brazilian women of all ages. Rio Grande do Sul, Brazil's southernmost state, has one of the highest breast cancer incidence rates of the country and increasing breast cancer mortality rates, despite efforts to improve breast cancer screening coverage. In addition, breast cancer is the leading cause of death by cancer in young women (30-49 years) from this region [11-13].

One of the most important breast cancer risk factors is a positive family history, and an estimated 5-10% of all diagnosed cases is hereditary, i.e., caused by germline mutations in high penetrance predisposition genes [14-16]. Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes are related to an increased risk for breast, ovarian and other cancers in a syndrome called Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) which corresponds to the majority of hereditary breast cancer worldwide [17-22]. Other BC-predisposition genes, such as *TP53* (associated to Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-*like* syndromes, LFS/LFL) [23-25] *PTEN* (associated with Cowden's syndrome) and *CHEK2* (associated to Hereditary Breast and Colon Cancer syndrome, HBOCC) [26] have been identified and are thought to have

important, albeit lower contributions to the phenotype [27, 28]. The identification of individuals with these syndromes is important to ensure that appropriate cancer risk reduction strategies are recommended to him/her and his family [29, 30].

Not much attention has been given to the identification and study of hereditary breast cancer phenotypes in the community and primary health care services [31-34]. In this context, the main purpose of this study was to assess the prevalence of a significant family history of cancer and of hereditary breast cancer phenotypes in an underserved community with high breast cancer incidence and mortality rates in Southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

In April of 2004, a large population-based cohort study (the Núcleo Mama Porto Alegre – NMAMA Cohort) was started in Porto Alegre, the capital of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. The cohort intends to collect demographic, epidemiologic and risk factor data of a large sample of women above the age of 15 years and, in addition, test a model for community-based breast cancer screening for those between ages 40-69, as described elsewhere [35, 36]. Women above age 15 years that visited primary health care units from the PSF program in 19 underserved areas of Porto Alegre were included in the NMAMA cohort from April 2004 through March 2006.

Patient recruitment. Family history (FH) of breast cancer and other tumors was assessed in all patients included in the NMAMA cohort by a 7 question instrument (Table 1) and considered both maternal and paternal histories in first-, second- and

third-degree relatives. The questionnaire has been validated for this population (data published elsewhere) and was based on features that have been associated with an increased likelihood of clinically significant *BRCA* mutations [30, 37-40]. Furthermore, a question about FH of breast cancer and/or colon cancer was included due to a previous suggestion of a higher than expect prevalence of such association in cancer genetic clinics of Porto Alegre [41]. Women older than 18 years answering positively to at least one of the questions at the primary care unit were referred for GCRA and invited to participate in this study. Ethical approval was obtained from the institutions involved and inclusion required signature of informed consent. Active recruitment was initiated after 6 months if patients referred by the PSF did not reach NMAMA and consisted of three attempts to schedule a visit by telephone, followed by an invitation letter and a search for the patient by community agents. If all strategies failed, or if three scheduled appointments were not kept, no further contact attempts were made.

Genetic Cancer Risk Assessment (GCRA). Genetic evaluation included medical and family histories recorded in detailed pedigrees with information traced as far backwards and laterally as possible, extending to paternal lines and including a minimum of three generations. Confirmation of the cancer FH was attempted in all cases and pathology reports, medical records and/or death certificates were obtained whenever possible [42]. Estimated lifetime breast cancer risks (ELTR) were obtained using the Claus Tables, Gail and Tyrer-Cuzick models [43-46]. For the clinical diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome, the American Society of Clinical Oncology (ASCO) criteria were used [47-49]. In addition, prior probabilities of carrying a *BRCA1* or *BRCA2* mutation were determined for each patient using mutation prevalence tables and the modified Couch (Penn II) mutation

probability model [40, 45, 50]. All pedigrees were reviewed by at least two clinical geneticists to assess presence of criteria for LFS, LFL, HBCC or other cancer predisposition syndromes. For LFS, LFL and HBCC previously published criteria for clinical diagnosis were used [23-26]. Three breast cancer risk categories were established: Risk I: < 0.2 using all three models of ELTR; Risk II: ≥ 0.2 with at least one of the models and Risk III: women with a family history fulfilling criteria for a breast cancer predisposition syndrome.

Follow up. All patients were encouraged to perform monthly breast self-examinations (BSE). Women with ELTR < 0.2 (Risk I) were referred back to their primary care units for prospective follow-up as determined by age and other non-genetic risk factors. Patients with estimates ≥ 0.2 (Risk II) and those fulfilling criteria for a hereditary cancer syndrome (Risk III) were referred to clinical breast evaluations at 6 month-intervals. Annual mammography and breast ultrasound were added for all patients between ages 40-69 and under the age of 50 years, respectively, or whenever indicated by the clinical examination. Those with an increased risk for tumors other than breast cancer were referred to tertiary care centers for inclusion in comprehensive cancer screening programs. Those with criteria for a breast cancer predisposition syndrome were offered genetic testing and results of this investigation will be described elsewhere. After conclusion of the genetic evaluation, written reports and a brochure with key information about breast cancer prevalence, treatment and prevention, as well as information about hereditary breast cancer, were mailed to all patients.

RESULTS

Description of the population served by the program. Women enrolled in this study were residents of 7 regions of the city of Porto Alegre, that together comprehend 305 km² or 64.0% of its area, and about 35.0% of its total population. All study subjects were regular users and relied almost exclusively on the PSF system for health care. Although specific demographic data on this population of PSF clients is unavailable, data of the most recent municipal census indicate that in these regions, 49.2% of the inhabitants have less than 8 years of education (5.6% are illiterate), 20.0% live in temporary homes and 6.5% of providers have no income [3, 51].

Patient recruitment. Of the 9218 women enrolled in the cohort, 1286 (13.9%) answered positively to at least one of the seven questions about FH of cancer (Figure 1) and those above age 18 years (n=1247) were referred for GCRA. Of these, 261 (21.0%) did not reach NMAMA and did not respond to the active recruitment strategies within a period of 12 months after inclusion in the cohort. In addition, 41 (3.3%) women scheduled an appointment three times and did not show and another 43 (3.4%) did not wish to participate in the study. The remaining 902 women from 829 families were compliant with the referral and attended GCRA. Comparison between demographic data of women with a positive family history that were submitted to GCRA (attenders) and those never evaluated (non-attenders) showed that they differed significantly in some aspects. Non-attenders were, on average, younger, less educated, and had less often been submitted to a breast biopsy ($p < 0.001$; supplementary data). Regarding cancer FH, a higher proportion of non-attenders referred both breast *and* ovarian cancer in a relative (Table 1). When the

answers to this question at the primary care unit were compared to the FH reported during GCRA (confirmed with medical records) among attenders, a low concordance level between responses was observed, i.e. with only one diagnosis (usually breast cancer) remaining in most cases (Kappa coefficient = 0.069). For the other questions, a significant difference in responses between the groups was only observed for a FH of breast and/or ovarian cancer in ≥ 2 relatives, but with a higher frequency of positive answers among attenders.

Risk Assessment. Demographic and other variables related to estimation of lifetime risk for developing breast cancer in the 902 attenders are summarized in Table 2. Of note, a significant proportion of women were smokers and overweight or obese, as also observed in the NMAMA cohort as a whole [35]. Regarding the family history of cancer, a high number of patients referred a positive history in the maternal lineage. A history of BC only, or BC and CRC were commonly reported. The majority of women evaluated, 688 (76.3%), did not fulfill criteria for a breast cancer predisposition syndrome. Of these, 633 (92.0%) and 55 (8.0%) women had estimated lifetime risks of developing breast cancer < 0.2 and ≥ 0.2 , respectively. The most common feature of the family history that justified genetic risk assessment in this group of patients was the presence of a relative with breast cancer $<$ age 50 years (Table 3). The remaining 214 women (23.7%) from 183 families had pedigrees suggestive of a breast cancer predisposition syndrome, the majority of them fulfilled criteria for the Li-Fraumeni-*like* syndrome (Figure 1). Twenty-five families fulfilled criteria for more than one syndrome. The 76 patients (65 families) fulfilling criteria for HBOC syndrome had average *BRCA* mutation probabilities of 21.9% (SD = 13.9%) and 25.7% (SD = 14.8%) by the Penn II model and *BRCA* mutation prevalence

tables, respectively. For all cancer-unaffected attenders, the ELTR were obtained using the Claus Tables, Gail and Tyrer-Cuzick models; mean estimates were 13.6%, 13.9% and 13.9%, respectively. Data on breast cancer family history and lifetime risk estimates for patients in the three distinct risk categories is summarized in Table 3.

DISCUSSION

Using a simple 7-question instrument to inquire about the family history of cancer in women from primary care units of an underserved region in Southern Brazil, we identified a significant proportion with cancer family histories fulfilling criteria for one of the most commonly recognized hereditary breast cancer syndromes. Although a phenotypic overlap between the HBOC, LFS/LFL and HBCC syndromes exists, the observed high frequency of LFL pedigrees is striking, especially considering that the original questionnaire used to identify these patients was not designed to screen for LFS/LFL. As early as 1999, Varley *et al* [52] already described certain low penetrance *TP53* alleles and suggested that deleterious mutations in *TP53* (or related genes) may be more frequent in the population than estimated previously. In addition, several recent reports have indicated that a deleterious germline mutation in *TP53*, R337H, might be very prevalent and related to a founder effect in Southern Brazil [53-55]. Therefore, although some of the criteria used here for the diagnosis of the LFL phenotype are quite relaxed and may not constitute per se an indication for *TP53* mutation testing in other countries, in this region LFL may indeed be a common hereditary breast cancer phenotype. Future results of germline mutation testing should help to clarify this issue, and contribute to our understanding of the applicability and discriminatory accuracy of breast cancer

risk estimation models, current diagnostic criteria and mutation prediction models for hereditary breast cancer syndromes in this population.

The relatively large proportion of attenders to the proposed GCRA (72.3%) is very encouraging, and comparable to that encountered in similar studies. As examples we cite the studies of Ricker *et al.* [56] and Chin *et al.* [57] in underserved communities from the U.S. and Singapore were 88.0% and 70.0% of appointments were kept by the patients, respectively. Furthermore, in a recent study by O'Neill *et al.* [58] in the U.S., the outcome of genetics referrals was evaluated in a group of women with an estimated *BRCA* mutation probabilities $\geq 10.0\%$. Within six-months after referral, 36.0% of patients had undergone genetic evaluations (acceptors), 27.0% still intended to seek (intenders) and 36.0% refused such assessment (decliners). Population-based mammographic screening programs worldwide, have also described variable compliance rates, around 61.0-83.0% [59-61].

In this study, the number of attenders has to be further interpreted in light of the difficulties that most of these women face to seek advice, health care and cancer prevention opportunities. First, there might be a cultural difference in cancer-associated risk perception and/or a difficulty in understanding the impact of preventive interventions. The way of dealing with risk is not only influenced by risk perception but also by culture. This was clearly demonstrated by Hofstede in a landmark study to characterize different cultures from nations around the world, using five parameters, including the uncertainty avoidance index (UAI) [62]. This index, which reflects the tolerability of a certain society towards uncertainty and ambiguity, is higher in the Brazilian society than in Denmark, the United Kingdom and the United States of America. Such difference could interfere with cancer risk perception and motivation to seek genetic cancer risk assessment. In addition, certain cultures are

more fatalistic about cancer and perceive fewer benefits from screening [63]. Second, there might be a knowledge barrier to the understanding of how preventive measures will ultimately increase quality of life [56, 64, 65]. Third, in many of these women, care of self is often set aside by more urgent needs, such as providing food, housing and education to their families. Finally, there has been an historical lack of resources to ensure that adequate screening is provided in this area, even if there is evidence for a higher risk [36]. For all of these reasons, programs such as the one presented here, that attempt to identify and prospectively follow women at increased risk for cancer, need to consider the importance of patient education and social interventions (i.e. facilitate transportation, nutrition and childcare) in the difficult task of maintaining compliance to the recommended guidelines. A more detailed study of non-attenders may give us better clues on how to improve coverage for programs such as these, ensuring that most high-risk patients have access to the information and preventive interventions.

Through the implementation of this GCRA program for an underserved community in Southern Brazil, we were able to determine that the overall prevalence of a hereditary breast cancer phenotype in the population-based sample of women studied was 2.3%, indicating that this may be a matter of considerable concern in this region. In addition, the establishment of breast cancer risk categories enabled the identification of higher risk women who may benefit from more intensive screening interventions. The relatively high number of women that attended GCRA sessions after an initial referral suggests that the program was well accepted by the community and is feasible, regardless of potential cultural, economic and social barriers.

REFERENCES

- [1] Panamerican Health Organization (PAHO) (2007). Available from: <http://www.paho.org/english/dd/ais/coredata.htm>. Cited 01 July 2007.
- [2] Brazilian Public Health System (SUS) (2007). Available from: <http://www.datasus.gov.br> Cited 03 April 2007.
- [3] Brazil: demographic data (2007). Available from: <http://www.ibge.gov.br>. Cited 03 June 2007.
- [4] Ramalho AS, Silva RB. Community genetics: a new discipline and its application in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2000; 16:261-263.
- [5] Brasil, Ministério da Saúde. Programa Saúde da Família: ampliando a cobertura para consolidar a mudança do modelo de Atenção Básica. *Rev Bras Saúde Materno-Infantil* . 2003; 3:113–125.
- [6] Brasil (2004) Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica. Atenção Básica e a Saúde da Família. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/atencaobasica.php>. Cited 10 March 2007.
- [7] Harzheim E, Duncan BB, Stein AT, *et al*. Quality and effectiveness of different approaches to primary care delivery in Brazil. *BMC Health Serv Res*. 2006; 6:156.
- [8] Penchaszadeh VB. Community genetics in Latin America: challenges and perspectives. *Community Genet*. 2000; 3:124-127.
- [9] Llerena JC Jr. Medical Genetics, Single Brazilian Health System (SUS) and integrated aspect in health attention and care. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2002; 7:17-41.
- [10] Palmero EI, Kalakun L, Schüler-Faccini L, *et al*. Cancer genetic counseling in public health care hospitals: the experience of three Brazilian services. *Community Genet*. 2007; 10(2):110-119.

- [11] Cadaval Gonçalves AT, Costa Jobim PF, Vanacor R, *et al.* Increase in breast cancer mortality in Southern Brazil from 1980 to 2002. *Cad Saúde Pública.* 2007; 23(8):1785-90.
- [12] Brazilian National Cancer Institute (2007). Available from: <http://www.inca.gov.br>. Cited 03 July 2007.
- [13] State of Rio Grande do Sul (2007). Available from: <http://www.rs.gov.br>. Cited 03 July 2007.
- [14] Margolin S, Lindblom A. Familial breast cancer, underlying genes, and clinical implications: a review. *Crit Rev Oncog.* 2006; 12(1-2):75-113.
- [15] De la Chapelle A, Peltromäki P. The genetics of hereditary common cancers. *Curr Opin Genet Dev.* 1998; 8:298-303.
- [16] Offit K. Clinical Cancer Genetics: Risk Counseling and Management. *Wiley-Liss, New York*; 1998.
- [17] Miki Y, Swenson J, Shattuck-Eidens D, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994; 266:66-71.
- [18] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2 to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994; 265:2088-2090.
- [19] Peto J, Collins N, Barfoot R, *et al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:943-949.
- [20] Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer.* 2000; 83:1301-1308.
- [21] Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF, *et al.* Risk models for familial ovarian and

breast cancer. *Genet Epidemiol.* 2000; 18:173-190.

[22] Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, *et al.* A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer.* 2002; 86:76-83.

[23] Li FP and Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969; 71:747-752.

[24] Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, *et al.* Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994; 54:1298-1304.

[25] Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995; 25:101-124

[26] Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, *et al.* The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Gen.* 2003; 72:1308-1314.

[27] Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, *et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988; 48:5358-5362.

[28] Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, *et al.* A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:432-438.

[29] Guillem JG, Wood WC, Moley JF, *et al.* ASCO/SSO Review of Current Role of Risk-Reducing Surgery in Common Hereditary Cancer Syndromes. *J Clin Oncol.* 2006; 24:4642-4660.

[30] Nelson HD, Huffman LH, Fu R, *et al.* U.S. Preventive Services Task Force Genetic Risk Assessment and BRCA Mutation Testing for Breast and Ovarian Cancer Susceptibility: Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2005; 143:362-379.

[31] Hall IJ, Burke W, Coughlin S, *et al.* Population-based estimates of the

prevalence of family history of cancer among women. *Community Genet.* 2001; 4:134-142.

[32] Pharoah PD, Lipscombe JM, Redman KL, *et al.* Familial predisposition to breast cancer in a British population: implications for prevention. *Eur J Cancer.* 2000; 36:773-779.

[32] de Silva D, Gilbert F, Needham G, *et al.* Identification of women at high genetic risk of breast cancer through the National Health Service Breast Screening Programme. *J Med Genet.* 1995; 32:862-866.

[34] Hoskins KF, Zwaagstra A, Ranz M. Validation of a tool for identifying women at high risk for hereditary breast cancer in population-based screening. *Cancer.* 2006; 107(8):1769-1776.

[35] Caleffi M, Ashton-Prolla P, Weber B, *et al.* Breast cancer screening in 10,000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (16S):877s.

[36] Smith RA, Caleffi M, Albert US, *et al.* Breast cancer in limited-resource countries: early detection and access to care. *Breast J.* 2006; 12 (Suppl 1):S16-S26.

[37] Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, *et al.* BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 1997; 336:1409-1415.

[38] Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M, *et al.* BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations. Risk factor analysis and implications for genetic testing. *JAMA.* 1997; 278:1242-1250.

[39] Srivastava A, McKinnon W, Wood ME. Risk of breast and ovarian cancer in women with strong family histories. *Oncology.* 2001;15:889-902.

[40] Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, *et al.* Clinical characteristics of individuals

with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1480-1490.

[41] Palmero EI, Ashton-Prolla P, da Rocha JC, *et al.* Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. *J Genet Couns.* 2007; 16(3):363-371.

[42] Roth FL, Camey SA, Caleffi M, *et al.* Consistency of Self-Reported First-Degree Family History of Cancer: A Population-Based Study. Submitted to *Community Genetics.* 2008

[43] Gail MH, Brinton LA, Byar DP, *et al.* Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 1998; 81:1879-1886.

[44] Claus EB, Risch N, Thompson D. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer.* 1994; 73:643-651.

[45] Domchek SM, Eisen A, Calzone K, *et al.* Application of Breast Cancer Risk Prediction Models in Clinical Practice. *J Clin Oncol.* 2003; 21:593-601.

[46] Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med.* 2005; 23(7):1111-1130. Erratum in: *Stat Med* (2005) 24(1):156.

[47] ASCO Subcommittee on Genetic Testing for Cancer Susceptibility. Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol.* 1996;14:1730-1736.

[48] Ford D, Easton DF, Stratton M, *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(3):676-689.

[49] National Comprehensive Cancer Network, USA (2007). Available from:

<http://www.nccn.org>. Cited 03 July 2007.

[50] Domchek SM, Blackwood MA, Tweed AJ, *et al.* University of Pennsylvania BRCA1/BRCA2 prediction model. In: Abstract presented at the Cancer Risk Prediction Models: A Workshop on Development, Evaluation, and Application. Washington, D.C. 20-21 May 2004.

[51] Porto Alegre (2004) Prefeitura Municipal. Gabinete do prefeito. Secretaria do Planejamento Municipal. Mapas da inclusão e exclusão social de Porto Alegre. Brazil.

[52] Varley JM, McGown G, Thorncroft M, *et al.* Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(4):995-1006.

[53] Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, *et al.* The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 2007; 245(1-2):96-102

[54] Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, *et al.* Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004; 48(5):647-650.

[55] Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, *et al.* Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 2008; 261(1):21-5.

[56] Ricker C, Lagos V, Feldman N, *et al.* If we build it...will they come ? – establishing a cancer genetics services clinic for an underserved predominantly latina cohort. *J Gene Couns.* 2006; 15(6):505-514.

[57] Chin TM, Tan SH, Lim SE, *et al.* Acceptance, motivators, and barriers in

attending breast cancer genetic counseling in Asians. *Cancer Detect Prev.* 2005; 29(5):412-418.

[58] O'Neill SM, Peters JA, Vogel VG, *et al.* Referral to cancer genetic counseling: are there stages of readiness? *Am J Med Genet C - Semin Med Genet* 2006; 142(4):221-231.

[59] O'Malley AS, Forrest CB and Mandelblatt J. Adherence of low-income women to cancer screening recommendations. *J Gen Intern Med.* 2002; 17(2):144-154.

[60] Banks E, Beral V, Cameron R, *et al.* Comparison of various characteristics of women who do and do not attend for breast cancer screening. *Breast Cancer Res.* 2002; 4(1):R1.

[61] Finney MF, Tumiel-Berhalter LM, Fox C, *et al.* Breast and cervical cancer screening for Puerto Ricans, African Americans, and non-Hispanic Whites attending inner-city family practice centers. *Ethn Dis.* 2006; 16(4):994-1000.

[62] Hofstede G. Cultures and organizations. *McGraw-Hill, New York;* 1997.

[63] Russell KM, Perkins SM, Zollinger TW, *et al.* Sociocultural context of mammography screening use. *Oncol Nurs Forum.* 2006; 33(1):105-112.

[64] Farmer D, Reddick B, D'Agostino R, *et al.* Psychosocial correlates of mammography screening in older African American women. *Oncol Nurs Forum.* 2007; 34(1):117-123.

[65] Achat H, Close G and Taylor R. Who has regular mammograms? Effects of knowledge, beliefs, socioeconomic status, and health-related factors. *Prev Med.* 2005; 41(1):312-320.

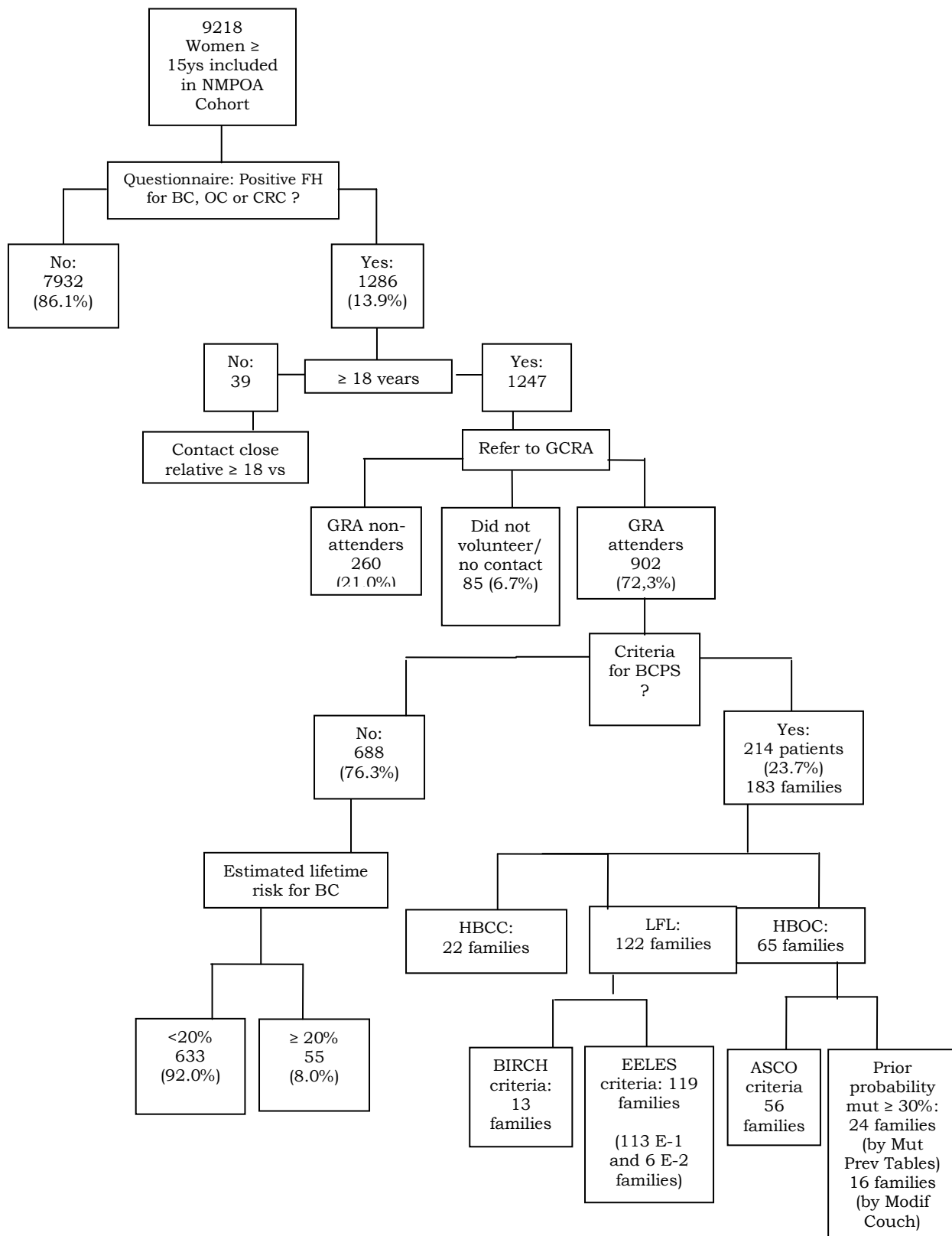


Figure 1. Preliminary results of genetic cancer risk assessment in a population-based cohort of women ≥ 15 years of age in Porto Alegre, Brazil.

Table 1. Positive responses to the family history questionnaire given by women referred to genetic risk assessment (GCRA). n = 1247; including GCRA attenders and non-attenders.

	GCRA non-attenders		GCRA attenders		p
	(n=345)		(n=902)		
	N	(%)	N	(%)	
Did any of your 1st degree relatives have breast or ovarian cancer ?	122	(35.4)	378	(42,0)	0.118
Did any of your relatives have bilateral breast cancer?	48	(14.1)	112	(12,4)	0.561
Did any man in your family have breast cancer?	6	(1.7)	11	(1,2)	0.590
Did any woman in your family have breast and ovarian cancer ?	47	(13.9)	44	(4,9)	p<0.001
Did any woman in your family have breast cancer before the age of 50 years?	214	(62.4)	568	(63,0)	0.551
Do you have 2 or more relatives with breast and/or ovarian cancer ?	63	(18.3)	226	(25,1)	0.016
Do you have 2 or more relatives with breast and/or bowel cancer ?	69	(20.2)	234	(25,9)	0.062

(*) one patient may have answered positively to more than one question.

Table 2. Demographics and variables of the 902 women evaluated for genetic risk assessment

	N	%	Mean	SD
Age at assessment	-	-	43.2	12.7
BMI			27.9	5.8
≤18.5	6	0.7	-	-
18.51-25	300	33.3	-	-
25.01,1-30	298	33.0	-	-
>30	285	31.6	-	-
Smoking	262	29.0	-	-
Age at menarche	-	-	12.7	1.7
Parity				
No children	108	12.0	-	-
One or more children	790	88.0	-	-
Age at birth of first child	-	-	21.5	5.0
Reproductive Status				
Pre-menopausal	585	65.2	-	-
Post-menopausal	312	34.8	-	-
Age at menopause	-	-	47.0	5.4
Endogenous hormone exposure (ys)	-	-	27.3	9.7
Hormone replacement therapy	73	8.1	-	-
Consanguinity[‡]	65	7.3	-	-
Family history of cancer				
Side of family				
Maternal	554	62.7	-	-
Paternal	223	25.2	-	-
Maternal and paternal	58	6.6	-	-
Others (siblings/offspring)	49	5.5	-	-
BC family history				
Breast cancer only	234	26.1	-	-
Breast and ovarian cancer	87	9.6	-	-
Breast and colon cancer	179	19.8	-	-

(‡) Evidence of consanguinity within family, regardless of relationship to the proband.

Table 3. Risk estimates and breast cancer history according to risk category in the 902 women submitted to genetic assessment.

	Estimated lifetime risk for breast cancer < 0.2 M(SD) n=633	Estimated lifetime risk for breast cancer ≥ 0.2 M(SD) n=55	Phenotype of Breast cancer predisposition syndrome M(SD) n=214	p
Number of BC cases in family*	0.98(0.67)	1.45(0.83)	1.69(1.14)	<0.001
Number of BC-affected generations*	0.92(0.54)	1.24(0.55)	1.29(0.64)	<0.001
Average age at BC diagnosis in the family	46.6(10.6)	47.0(11.4)	46.6(11.2)	0.968
ELTR for BC				
Using the Gail** model	10.2(4.1)	19.2(5.1)	12.3(6.6)	<0.001
Using the Claus* model	10.2(2.8)	16.7(7.8)	13.9(7.4)	<0.001
Using the Tyrer-Cuzick** model	9.8(3.7)	19.6(6.2)	12.4(5.6)	<0.001
Prior probability of mutation in a <i>BRCA</i> gene				
Mutation Prevalence Tables***	6.3(3.8)	6.7(3.9)	13.2(13.0)	<0.001
Modified Couch Model***	9.7(4.3)	10.3(5.0)	14.8(10.6)	<0.001

M=mean; SD=standard deviation; BCPS=breast cancer predisposition syndrome; BC=breast cancer; ELTR=estimated lifetime risk

* The group with average-slightly increased risk has a mean value that is significantly lower than the other two groups.

** The mean values in all three groups differ significantly from each other.

*** The group with criteria for a breast cancer predisposition syndrome has a mean value that is significantly higher than that of the other two groups.

Note: The number of valid cases used in each of the ELTR and prior probability analyses was as follows: for the Gail, Claus and Tyrer-Cuzick models, 878, 592 and 874 valid cases, respectively. For the mutation prevalence tables and the modified Couch model, 890 and 874 valid cases, respectively.

7.15. Artigo publicado na revista *Cancer Letters*

Author's personal copy



Available online at www.sciencedirect.com



Cancer Letters 261 (2008) 21–25



www.elsevier.com/locate/canlet

Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil

Edenir Inêz Palmero ^{a,b}, Lavínia Schüler-Faccini ^{a,c,d}, Maira Caleffi ^e,
Maria Isabel Waddington Achatz ^f, Magali Olivier ^g, Ghyslaine Martel-Planche ^g,
Virginie Marcel ^g, Ernestina Aguiar ^{b,h}, Juliana Giacomazzi ^{b,h},
Ingrid Petroni Ewald ^{b,h}, Roberto Giugliani ^{a,b,c,d,h},
Pierre Hainaut ^g, Patricia Ashton-Prolla ^{a,b,c,d,*}

^a Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

^b Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisas Biológicas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^c Department of Genetics, UFRGS, Brazil

^d Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^e Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil

^f Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil

^g Molecular Carcinogenesis and Biomarkers Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

^h Post-Graduate Program in Medical Sciences, UFRGS, Brazil

Received 30 October 2007; received in revised form 30 October 2007; accepted 31 October 2007

Abstract

Germline *TP53* mutations predispose to a rare familial cancer syndrome, the Li–Fraumeni Syndrome (LFS), characterized by the early onset of multiple cancers including childhood adrenocortical carcinomas, sarcomas and brain tumors, and breast and colon cancer in young adults. An identical germline mutation at codon 337 in *TP53* (R337H) has been shown to be causally related to an increased risk of multiple cancers in unrelated subjects with familial cancer risk in Southern Brazil. Here we have assessed the prevalence of R337H in 750 healthy women participating in a community-based breast cancer screening program in the area of Porto Alegre. The mutant was detected in two participants (0.3%) who were fourth-degree relatives and reported a familial history of cancer at multiple sites that did not match classical criteria for LFS and its variants. Testing in additional family members detected the mutation in three subjects, one of whom developed breast cancer at the age of 36. These findings indicate that R337H may be a low penetrance mutant which predisposes to multiple cancers and occurs in the population of Southern Brazil at a frequency 10–20 times higher than other *TP53* mutants commonly associated with LFS.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Present address: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903 Porto Alegre RS, Brazil. Tel.: + 55 51 2101 8011; fax: + 55 51 2101 8010.

E-mail address: pprolla@hepa.ufrgs.br (P. Ashton-Prolla).

Keywords: *TP53* mutations; Li–Fraumeni syndrome; Breast cancer predisposition; Inherited breast cancer

1. Introduction

Germline mutations in *TP53* are associated with inheritance of the Li–Fraumeni Syndrome (LFS, OMIM #151623), a rare autosomal dominant disorder characterized by a familial clustering of tumors, with a predominance of sarcomas, breast cancers, brain tumors and adrenocortical carcinomas, diagnosed before the age of 45 years [13,14]. Other cancers, such as leukemia, lung cancer, skin melanoma, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, and prostate cancer are also present in excess in some families and, in some cases, germ cell tumors, choroid plexus papilloma and Wilms tumor have been reported as part of the spectrum [8,9,11,3,20]. The diagnostic criteria were initially defined as presence in the family of one individual with sarcoma before the age of 45, one first-degree relative with any cancer under the age of 45 and another first- or second-degree relative with any cancer under age 45 or sarcoma at any age. Germline mutations in *TP53* are found in 70% of cancer-prone families fulfilling this definition. Subsequently, a number of families with tumor patterns that resemble LFS but do not fulfill the original criteria have been described, leading to different definitions of Li–Fraumeni-like (LFL) syndromes. Germline *TP53* mutations are present in 20–40% of the families matching LFL definitions [3,7,16].

In a study of 45 Brazilian families matching at least one of the clinical definitions of LFL [1], six were found to carry a particular germline *TP53* mutation at codon 337 (CGC to CAC, arginine to histidine, R337H). This mutation has been initially identified in the germline of subjects from Southern Brazil who developed childhood adrenocortical carcinoma (ADC) but no other cancer, suggesting that R337H may exert tissue-specific effects and predispose exclusively to this tumor type [19]. In contrast with these observations, we have found that R337H was present in the germline of subjects from families with a wide spectrum of inherited cancers, compatible with LFL definitions. Of a total of 56 histologically confirmed tumors in six families, the most common tumors were breast cancer (30.4%), soft tissue sarcomas (10.7%), brain tumors (10.7%), adrenocortical carcinomas (8.9%) and gastric cancer (8.9%). Sequencing of *TP53* in a breast cancer case

showed loss of the wild-type allele and retention of R337H suggesting that the mutant allele played a role in the development of this tumour. Furthermore, there is evidence in these families that cancer risk segregates with R337H mutation carriage. However, R337H was detected in several unaffected family members, suggesting that the penetrance of this mutation may be lower than that of conventional *TP53* mutations associated with LFS/LFL [1]. Compatible with this hypothesis, biochemical evidence indicates that the mutation has special, pH-dependent functional properties. The mutant protein forms oligomers and retains wild-type activity at pH 7, but fails to do so at pH 8, thus displaying a mutant phenotype only in pH conditions at the upper limit of the physiological range [6]. This dependence upon subtle changes in biochemical conditions may explain the variable patterns of cancers in families who carry this mutation in the germline. Outside Brazil, this mutation has been reported only once in a family of Portuguese background [5]. The reason why R337H occurs at a high frequency in cancer-prone families in Southern Brazil is unknown. Analysis of hypervariable microsatellite *loci* within the *TP53* gene supports the hypothesis of a founder effect [17].

Taken together, the conditional character of this mutant as well as the possibility of a founder effect has led us to suggest that the mutant allele may be relatively common in the general population of Southern Brazil, but may express its deleterious properties only in particular physio-pathological contexts. In the present study, we have analyzed the presence of R337H in the germline of 750 healthy volunteers from the area of Porto Alegre, Brazil's southernmost capital. Here we report the presence of the mutant R337H in two Brazilian subjects (0.3%), who both belonged to the same family with a positive cancer history but without the LFS/LFL clinical profile.

2. Materials and methods

In the present study, we have assessed the prevalence of R337H in the germline of a consecutive group of 750 cancer-unaffected women aged 40–69, participating in a breast cancer mammography screening program that covers 18 health districts in the city of Porto Alegre [4]. All

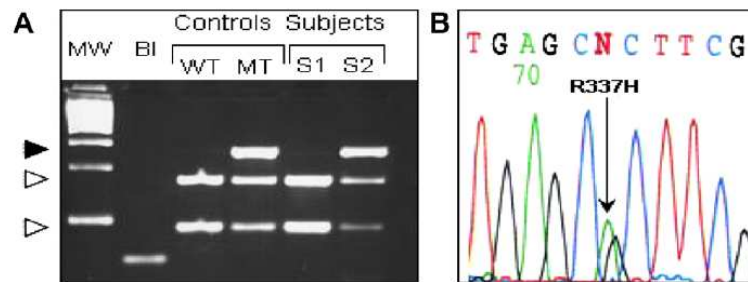


Fig. 1. Detection of R337H by restriction fragment length polymorphism and sequencing. DNA extracted from peripheral blood was amplified by PCR to generate a 238-base pair product encompassing exon 10 and flanking splice sites. (A) Restriction length fragment polymorphism (RFLP) analysis with HhaI. Black arrowhead: uncleaved fragment (mutant); white arrowhead: cleavage products (wild-type). MW, molecular weight marker; BI, blank. S1 and S2 are two subjects with wild-type and mutant codon 337, respectively. (B) Sequencing of an independent PCR product of sample S2 showing a G to A transition at the second base of codon 337.

participants signed informed consent and provided a blood sample. At recruitment, demographic data and information on individual and familial risk of breast cancer (BC) were collected through a structured questionnaire.

DNA was extracted from peripheral blood using standard procedures [15] and amplified with primers hybridizing to *TP53* in introns 9 and 10 to generate a 238-base pair PCR product encompassing the entire exon 10 plus flanking splice sites. This product was analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the restriction enzyme HhaI, which specifically cleaves a DNA sequence that is scrambled by mutation at codon 337 [1]. The uncleaved mutant allele was identified in 4% agarose gels after ethidium bromide staining, and the nature of the mutation was determined by bi-directional, automated sequencing of an independent PCR product (Fig. 1).

3. Results

All patients were cancer-unaffected, unselected for family history and reported no particular breast-related complaints at inclusion. The mean age of the participants was 51.1 years and the majority of women were found to have either no abnormalities or benign findings on mammography (BIRADS 1, 2 or 3: 99.1%).

The R337H mutant was detected in two of the 750 participants (0.3%). Clinical examinations of the breast and mammographies were normal (BIRADS 1) in both participants, and none of them reported a previous diagnosis of cancer. However, the two participants reported a familial history of cancer, and were found to be fourth-degree relatives (Fig. 2). The participants (III.6 and IV.12) were re-contacted, informed of their results, and additional at-risk family members were invited to participate in the study. Those interested in participating provided an extended family history and a blood sample for R337H testing after informed consent. The mutation was found in three addi-

tional family members: one woman affected with breast cancer at the age of 36 years (IV.13) and two asymptomatic 62- and 80-year-old women (II.2, III.12). Furthermore, genotyping for three common polymorphisms in intron 2 (PIN2, rs1642785) [18] intron 3 (PIN 3) [12,10] and exon 4 (PEX4, rs1042522) [2] indicated that subjects with R337H share a common set of polymorphisms, compatible with the hypothesis that the same mutant haplotype is present in all R337H carriers.

4. Discussion

The results observed in this study suggest a much higher prevalence for the R337H mutant than that of other *TP53* germline mutations causing the LFS/LFL syndromes in the general population. The two subjects that were initially found to be R337H carriers belonged to a large family in which eight cases of cancer were ascertained, five of whom are part of LFS tumor spectrum. However, the tumor pattern observed in this pedigree does not match any of the clinical definitions of well-characterized cancer predisposition syndromes, including classical LFS and LFL criteria. This may explain why this family has not been so far recognized as at-risk for familial cancer. These observations do not by themselves support the conclusion that R337H is causally related to an increased risk of multiple cancers. However, taken together with our previously reported results in R337H families recruited in high-risk cancer genetics clinics (see Introduction, [1]), they concur to identify R337H as a low-penetrance mutation which is common in the population of Southern Brazil. Taken together, the information available on tumor patterns in R337H carriers suggests that the mutation has a low penetrance and it is likely that many carrier

NMPOA Team for their essential role in recruiting and managing the NMPOA cohort. This study was supported in part by the following grants: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Grant No. 40.0949/2005-9) to R. Giugliani; Susan G. Komen for the Cure (Grant POP 0403033) to P. Ashton-Prolla, Fundação de Incentivo à Pesquisa Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA, Project 05-182) to L. Schüler-Faccini; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – PRODOC Grant No. 00202/03-7) and a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PSUS) grant to P. Ashton-Prolla. EI Palmero was supported in part by grants from The International Agency for Research in Cancer (IARC) and CNPq (Process No. 203732/2005-7).

References

- [1] M.I.W. Achatz, M. Olivier, F. LeCalvez, G. Martel-Planche, A. Lopes, B.M. Rossi, P. Ashton-Prolla, F.R. Vargas, J.C. JCasali da Rocha, A.L. Vettore, P. Hainaut, The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li–Fraumeni and Li–Fraumeni-like syndromes in Brazilian families, *Cancer Lett.* 245 (2007) 96–102.
- [2] G. Beckman, R. Birgander, A. Sjalander, N. Saha, P.A. Holmberg, A. Kivela, L. Beckman, Is p53 polymorphism maintained by natural selection?, *Hum Hered.* 44 (5) (1994) 266–270.
- [3] J.M. Birch, A.L. Hartley, K.J. Tricker, J. Prosser, A. Condie, A. Kelsey, M. Harris, P.H.M. Jones, A. Binchy, D. Crowther, A.W. Craft, O.B. Eden, G.R. Evans, E. Thompson, J.R. Mann, J. Martin, E.L.D. Mitchell, M.F. Santibañez-Koref, Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li–Fraumeni families, *Cancer Res.* 54 (5) (1994) 1298–1304.
- [4] M. Caleffi, P. Ashton-Prolla, B. Weber, J.M. Zignani, E.C. Dias, L.P. Antunes, A. Bedin Jr., E. Lisboa, M. Graudenz, P.R. Pohlmann, D. Duarte Filho, Breast cancer screening in 10,000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort, *J. Clin. Oncol.* 23 (16 S) (2005) 877s, abstract# 9664.
- [5] A. Chompret, L. Brugieres, M. Ronsin, M. Gardes, F. Dessarps-Freichy, A. Abel, D. Hua, L. Ligot, M.G. Dondon, B. Bressac-de Paillerets, T. Frebourg, J. Lemerle, C. Bonaiti-Pellie, J. Feunteun, P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals, *Br. J. Cancer* 82 (12) (2000) 1932–1937.
- [6] E.L. DiGiammarino, A.S. Lee, C. Cadwell, W. Zhang, B. Bothner, R.C. Ribeiro, G. Zambetti, R.W. Kriwachi, A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer, *Nat. Struct. Biol.* 9 (1) (2002) 12–16.
- [7] R.A. Eeles, Germline mutations in the TP53 gene, *Cancer Surv.* 25 (1995) 10–24.
- [8] T. Frebourg, N. Barbier, Y.X. Yan, J.E. Garber, M. Dreyfus, J. Fraumeni Jr., F.P. Li, S.H. Friend, Germ-line p53 mutations in 15 families with Li–Fraumeni syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 56 (3) (1995) 608–615.
- [9] J.E. Garber, E.M. Burke, B.L. Lavalley, A.L. Billett, S.E. Sallan, R.M. Scott, W. Kupsy, F.P. Li, Choroid plexus tumors in the breast cancer-sarcoma syndrome, *Cancer* 66 (12) (1990) 2658–2660.
- [10] F. Gemignani, V. Moreno, S. Landi, N. Moullan, A. Chabrier, S. Gutierrez-Enriquez, J. Hall, E. Guino, M.A. Peinado, G. Capella, F. Canzian, A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA, *Oncogene* 23 (10) (2004) 1954–1956.
- [11] A.L. Hartley, J.M. Birch, K. Tricker, S.A. Wallace, A.M. Kelsey, M. Harris, P.H. Jones, Wilms’ tumor in the Li–Fraumeni cancer family syndrome, *Cancer Genet. Cytogenet.* 67 (2) (1993) 133–135.
- [12] V. Lazar, F. Hazard, F. Bertin, N. Janin, D. Beller, B. Bressac, Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene, *Oncogene* 8 (6) (1993) 1703–1705.
- [13] F.P. Li, J.F. Fraumeni Jr., Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome, *J. Natl. Cancer Inst.* 43 (6) (1969) 1365–1373.
- [14] F.P. Li, J.F. Fraumeni Jr., J.J. Mulvihill, W.A. Blattner, M.G. Dreyfus, M.A. Tucker, R.W. Miller, A cancer family syndrome in twenty-four kindreds, *Cancer Res.* 48 (18) (1988) 5358–5362.
- [15] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (3) (1988) 1215, Feb 11.
- [16] M. Olivier, R. Eeles, M. Hollstein, M.A. Khan, C.C. Harris, P. Hainaut, The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users, *Hum. Mutat.* 19 (6) (2002) 607–614.
- [17] E.M. Pinto, A.E. Billerbeck, M.C. Villares, S. Domence, B.B. Mendonca, A.C. Latronico, Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48 (5) (2004) 647–650.
- [18] L.M. Pleasants, M.F. Hansen, Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene, *Hum. Genet.* 93 (5) (1994) 607–608.
- [19] R.C. Ribeiro, F. Sandrini, B. Figueiredo, G.P. Zambetti, E. Michalkiewicz, A.R. Lafferty, L. De Lacerda, M. Rabin, C. Cadwell, G. Sampaio, I. Cat, C.A. Stratakis, R. Sandrini, An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (16) (2001) 9330–9335.
- [20] L.C. Strong, M. Stine, T.L. Norsted, Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives, *J. Natl. Cancer Inst.* 79 (6) (1987) 1213–1220.

