

**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  
*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em mulheres participantes de um  
programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre**

**Ernestina Silva de Aguiar**

**Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ashton-Prolla**

**Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani**

**Dissertação de Mestrado**

**2009**

**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  
*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em mulheres participantes de um  
programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre**

**Ernestina Silva de Aguiar**

**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**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

XXXX Aguiar, Ernestina

Fatores de risco para câncer de mama e polimorfismos genéticos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre/ Ernestina Silva de Aguiar; orient. Patricia Ashton-Prolla – Porto Alegre, 2009.

XXX f.: il.

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

Orientador: Ashton-Prolla, Patricia

**Este trabalho recebeu fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo 400949/2005-9, Susan G Komen For The Cure (Pop0403033) e Fundação Incentivo à Pesquisa / Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Fipe/Hcpa) Projeto 05-182.**

**Dedico essa dissertação de Mestrado a minha família, que sempre esteve ao meu lado, e que me apoiou durante todos os momentos, especialmente minha mãe, Tereza M. Garcia e meu marido, João Eduardo S. de Aguiar.**

**A Deus, pelas oportunidades colocadas em minha vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

Às pacientes pela confiança e disponibilidade em participar do projeto.

A minha mãe, pelo carinho e amor com que me ensinou os verdadeiros valores da vida.

A minha segunda família, vô Horácio e vó Zélia, pelo carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido João Eduardo, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

À Professora Dra. Patrícia Ashton-Prolla, pela sua orientação, pelo seu apoio, e pelo seu carinho nos momentos de dificuldade.

Ao Professor Dr. João Carlos Prolla, pelo incentivo em fazer o mestrado e pelo meu ingresso no Grupo de Oncogenética do Laboratório de Medicina Genômica.

À Professora Dra. Suzi Camey, pela dedicação e disponibilidade na análise dos dados e pelas divertidas partidas de futebol.

Aos professores Dr. Roberto Giugliani e Dra. Maira Caleffi, pela oportunidade de conduzir esta pesquisa.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas que fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional nos últimos anos.

Aos colegas do Núcleo Mama Porto Alegre pelo apoio à realização deste projeto, em especial, Karen Barbosa e Giovana Skonieski.

A Pollyanna Almeida pela sua ajuda em diversos momentos do projeto e pela sua sincera amizade.

A Edenir Inês Palmero pela amizade e pelas partidas de futebol.

Aos colegas e amigos do laboratório de Medicina Genômica: Juliana Giacomazzi, Ingrid Petroni Ewald, Silvia Liliana Cossio, Jamile Abud, Carlos Eduardo Pitroski,

Patrícia Izetti Ribeiro, Liliane Todeschini, Gabriel Macedo, Cristina Rossi e Patrícia Koehler dos Santos pela amizade e coleguismo em todos os momentos.

Às colegas e amigas da Fundação Universitária de Cardiologia (Hospital Padre Jeremias): Tatiana Brittos, Fernanda Concli Leite, Dione Andrade, Maria Cristina Gravina e Vânia Raupp pela amizade.

Às amigas Ana Cecília Mano Azevedo, Juliana Chemin, Kátia Adriani Ferreira, Márcia Carla Ferreira e Vanessa Sandri pelo apoio e pela amizade.

Aos meus afilhados Isac Flores, Natalia Piccoli e Nicolas Piccoli, por serem motivos de alegria em minha vida.

## **ESTRUTURA**

**Após os itens INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA, JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS, esta dissertação apresenta um manuscrito redigido no modelo do periódico a que será submetido (CLIMACTERIC).**

**O item CONSIDERAÇÕES FINAIS contém dados detalhados da metodologia utilizada nesse trabalho, interpretações e comentários gerais.**

**O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se somente às citações que aparecem no texto da dissertação e não no artigo.**

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
2.1. Epidemiologia do Câncer de Mama .....	22
2.2. Genética do Câncer de Mama.....	24
2.2.1. Mutações em genes de alta penetrância .....	24
2.2.2. Polimorfismos em genes de baixa penetrância .....	25
2.3. Fatores de Risco para Câncer de Mama.....	28
2.3.1. Idade.....	28
2.3.2. Etnia.....	29
2.3.3. Fatores Reprodutivos e Hormonais .....	30
2.3.3.1. Menarca e Menopausa .....	30
2.3.3.2. Gestação .....	30
2.3.3.3. Amamentação.....	31
2.3.3.4. Hormônios Exógenos .....	31
2.3.4. Fatores Ambientais, Hábitos e Costumes.....	31
2.3.4.1. Poluentes ambientais .....	31
2.3.4.2. Tabagismo .....	33
2.3.4.3. Etilismo .....	33
2.3.4.4. Índice de Massa Corporal.....	34

2.3.5. História Pessoal de Câncer de Mama.....	35
2.3.6. História Familiar de Câncer de Mama.....	36
2.4. Modelos de Estimativa para Câncer de Mama.....	36
2.4.1. Modelo de Gail.....	36
2.4.2. Modelo de Claus.....	37
2.4.3. Modelo de Tyrer-Cuzick.....	37
2.5. Rastreamento do Câncer de Mama .....	39
2.5.1. Densidade Mamária e BI-RADS .....	40
2.6. Xenobióticos e sua metabolização no organismo .....	42
2.7. Polimorfismos Genéticos associados ao Câncer de Mama: Genes que codificam enzimas de biotransformação .....	44
2.7.1. Genes de fase II: família glutationa-s transferase.....	44
2.7.1.1. Gene <i>GSTM1</i> .....	45
2.7.1.2. Gene <i>GSTT1</i> .....	46
2.7.1.3. Gene <i>GSTP1</i> .....	47
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
3.1. Justificativa.....	49
3.2. Objetivos .....	50
3.2.1. Geral.....	50
3.2.2. Específicos .....	50
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>5. MANUSCRITO .....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
7.1. Frequências genotípicas e fenotípicas dos polimorfismos estudados.....	81
7.1.1 Polimorfismos <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> .....	81
7.1.2 Polimorfismo <i>GSTP1 A/G</i> .....	83

7.2. Cálculos de equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	85
7.3. Protocolo de extração de DNA .....	86
7.4. Protocolo de PCR-Multiplex dos Polimorfismos <i>GSTT1</i> e <i>GSMT1</i> .....	88
7.5. Protocolo de PCR Tempo Real do Polimorfismo <i>GSTP1A/G</i> .....	90
7.6. Seqüências das sondas utilizadas para análise do polimorfismo analisado por PCR Tempo Real .....	90
7.6.1. Polimorfismo <i>GSTP1 A/G</i> : .....	90
7.7. Gráficos de discriminação alélica e amplificação do polimorfismo <i>GSTP1 A/G</i> analisado por PCR Tempo Real.....	91
7.8. Carta de Aprovação do Projeto no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clinicas de Porto Alegre .....	93
7.9. Carta de Aprovação do Projeto no Instituto de Educação de Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento .....	94
7.10. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	95
7.11. Ficha de Levantamento de Dados do Núcleo Mama Porto Alegre.....	96
7.12. Ficha de Anamnese do Núcleo Mama Porto Alegre.....	97
7.13. Produção científica relacionada. Palmero <i>et al.</i> 2008. ....	100
7.14. Produção científica relacionada. Ashton-Prolla <i>et al.</i> 2009. ....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	-	Anticoncepcional oral
BIRADS	-	<i>Breast Image Reporting and Data System</i>
CM	-	Câncer de mama
IMC	-	Índice de massa corporal
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de magnésio
NH <sub>4</sub> Ac	-	Acetato de amônio
NMPOA	-	Núcleo Mama Porto Alegre
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PSF	-	Programa da Saúde e da Família
OR	-	<i>Odds ratio</i>
RR	-	Risco Relativo
RS	-	Estado do Rio Grande do Sul
SNP	-	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TRH	-	Terapia de reposição hormonal
GST	-	<i>Glutathiona S-transferase</i>
GSTP1	-	<i>Glutathiona S-transferase pi</i>
GSTM1	-	<i>Glutathiona S-transferase mu</i>
GSTT1	-	<i>Glutathiona S-transferase theta</i>
Ile	-	isoleucina
Val	-	valina
PAHs	-	Polycyclic aromatic hydrocarbons (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes de suscetibilidade ao câncer de mama e frequências genotípicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem câncer de mama. ....	27
Tabela 2. Variáveis utilizadas para estimar o risco de desenvolver câncer de mama nos Modelos de Gail, Claus e Tyrer-Cuzick. ....	38
Tabela 3. Classificação de exame de mamografia pelo Sistema BIRADS. ....	40
Tabela 4. Categorias de densidade da mama. ....	40
Tabela 5. Polimorfismos GSTT1(-), GSTM1(-) em mulheres sem câncer de mama	81
Tabela 6. Polimorfismos GSTT1(-), GSTM1(-) em mulheres com câncer de mama	.82
Tabela 7. Polimorfismo GSTP1 (Ile105Val) em mulheres sem câncer de mama.....	83
Tabela 8. Polimorfismo GSTP1 (Ile105Val) em mulheres com câncer de mama.....	84
Tabela 9. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra total de mulheres do estudo (n= 750) .....	85
Tabela 10. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres brancas do estudo (n= 599) .....	85
Tabela 11. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres não-brancas do estudo (n= 151) .....	85
Tabela 12. Componentes para a reação de PCR-Multiplex. ....	88
Tabela 13. Componentes para a reação de PCR em tempo real.....	90

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores associados com aumento (↑) ou diminuição (↓) do risco de câncer de mama em mulheres. ....	28
Figura 2. Interação entre as Enzimas metabolizadoras de Fase I e Fase II, e como elas contribuem para toxicidade, mutação e câncer. ....	43
Figura 3: Foto do gel de agarose contendo os possíveis genótipos para os polimorfismos dos genes GSTM1 e GSTT1.....	89

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Discriminação alélica do polimorfismo GSTP1 A/G. ....	91
Gráfico 2. Amplificação de uma amostra (genótipo AA do polimorfismo GSTP1 A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC. ....	91
Gráfico 3. Amplificação de uma amostra (genótipo GG do polimorfismo GSTP1 A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com FAM. ....	92
Gráfico 4. Amplificação de uma amostra (genótipo AG do polimorfismo GSTP1 A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM. ....	92

## RESUMO

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. É uma doença multifatorial causada pela combinação de fatores de risco genéticos e não genéticos (ambientais). Polimorfismos genéticos de baixa penetrância têm sido associados ao CM em diversas populações. No presente estudo, determinamos a freqüência alélica e genotípica dos polimorfismos nulos de *GSTM1*, *GSTT1* e do polimorfismo Ile105Val em *GSTP1*, e correlacionamos estas freqüências com fatores de risco para CM. A amostra estudada foi constituída de 750 mulheres (40-69 anos) sem câncer de mama recrutadas na Coorte Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). As freqüências genotípicas e alélicas encontradas não diferem de outros estudos nacionais, mas diferem significativamente de algumas descritas em outras populações, reforçando a necessidade de estudos de populações específicas. A amostra como um todo não apresentou fatores de risco reprodutivos significativos para CM. O risco vital médio de desenvolver CM de acordo com o modelo de Gail na amostra foi de 7.8% e a grande maioria das pacientes (n= 731, 97.5%), como esperado para uma amostra de mulheres submetida a rastreamento mamográfico, apresentou achados mamográficos benignos (*BIRADS* 1 ou 2). A distribuição das mulheres de acordo com a densidade mamográfica demonstrou que apesar de 56% já estarem na pós-menopausa, a maioria (n= 682, 91.0%) ainda apresentava mamas moderadamente densas. Observou-se que 77.6% das mulheres incluídas no estudo tinham um IMC correspondente a sobrepeso ou obesidade. A análise da relação entre os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* A/G e fatores de risco previamente estabelecidos para CM, demonstrou, em mulheres pré-menopáusicas, uma

associação entre os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos e imagens mamográficas com classificação BIRADS 3 e 4 e, em mulheres pós-menopáusicas, uma associação com mamas moderadamente densas e densas. Isoladamente, o genótipo *GSTT1* nulo também se mostrou associado a maior densidade mamográfica em mulheres pós-menopáusicas. Não houve associação entre os alelos e genótipos de *GSTP1* e fatores de risco estabelecidos. Nossos dados sugerem que os genótipo nulos de *GSTM1* e especialmente de *GSTT1* podem estar fortemente associados a densidade mamográfica em mulheres pós-menopáusicas. A inclusão de análises genótípicas e fatores de risco especialmente prevalentes em uma determinada população poderia ser considerada para aprimorar a estimativa de risco de câncer de mama em populações específicas. No entanto, estudos adicionais do tipo caso-controle devem ser realizados para melhor determinar a relação de risco entre polimorfismos em genes de baixa penetrância, fatores de risco para câncer de mama e ocorrência de CM em si.

## ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the second most frequent malignant tumor in the world and the most frequent in women. It is a multifactorial disease caused by a combination of genetic and non-genetic risk factors. Polymorphisms in low penetrance genes have been associated to breast cancer risk in several populations. In the present study, we determine the allelic and genotypic frequencies of the *GSTM1* and *GSTT1* null polymorphisms and the *GSTP1* Ile105Val polymorphism, and correlate these frequencies to breast cancer risk factors. The sample studied included 750 women (40-69 years) without cancer who participated in the mammographic screening program from the Núcleo Mama Porto Alegre Cohort (NMPOA). The allelic and genotypic frequencies observed did not differ from those reported in other studies with Brazilian samples, but differed significantly from those described in other countries, reinforcing the need for population-specific investigations of polymorphisms in low penetrance genes and their associations with cancer risk. Overall, the women included did not have significant reproductive risk factors for BC. The average lifetime risk of BC estimated according to the Gail model was 7.8% and most patients (n= 731, 97.5%), as expected for women submitted to routine mammographic screening, had benign mammographic findings (*BIRADS* 1 ou 2). Regarding breast density, although 56% of the women studied were post-menopausal, most (n= 682, 91.0%) still presented moderately dense breasts. We observed that 77.6% of the women included in the study had a body mass index (BMI) corresponding to overweight or obesity. Furthermore, an association between the combined *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes and mammographic images classified as *BIRADS* 3 e 4 was observed in pre-menopausal women and an

association between these genotypes and moderately dense or dense breasts was observed in post-menopausal women. When each genotype was analysed individually, *GSTT1* null was also associated to increased mammographic density in post-menopausal women. There was no association between the alleles and/or genotypes *GSTP1* and BC risk factors in this study. Our data suggest that the *GSTM1* and especially *GSTT1* null genotypes may be strongly related to mammographic density in post-menopausal women. The inclusion of genotypic analyses and frequent breast cancer risk factors for specific populations in risk models could be considered to improve breast cancer risk estimates in such populations. However, additional case-control studies should be performed to better establish the relationship of the polymorphisms studied here with breast cancer risk factors and breast cancer itself.

## 1. INTRODUÇÃO

Células anormais que resultam de alterações em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular, geralmente não respondem aos sistemas de controle do ciclo celular e são capazes de se expandir indefinidamente. Essas células dão origem a massas tumorais benignas ou malignas e a estas últimas denomina-se câncer (Cavenee e White, 1996).

O câncer é uma das doenças mais antigas da humanidade e uma das principais causas de morte na atualidade devido à alta incidência (cerca de dez milhões de indivíduos são diagnosticados com a doença a cada ano). Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a causa de óbito de mais de seis milhões de indivíduos ao ano, representando cerca de 12% das mortes (Organização Mundial da Saúde 2002; Organização Mundial da Saúde 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, no Brasil, no ano de 2005, 14,8% das mortes foram causadas pelo câncer, e estimativas referem que esse número será mais elevado no ano de 2030 (17,2% das mortes) (Organização Mundial da Saúde 2005).

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2008, indicam que ocorreram 470 mil novos casos de câncer. Os tipos de câncer que mais acometem o sexo masculino são: à exceção de pele não-melanoma, tumores de próstata, pulmão e estômago. No sexo feminino, à exceção do câncer de pele não-melanoma, câncer de mama, colo do útero e câncer colorretal, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (Instituto Nacional do Câncer 2008).

Atualmente, o câncer de mama (CM) é o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo e o mais freqüente entre as mulheres, constituindo um grave

problema de saúde pública em todos os países pela alta incidência e pelo elevado custo no tratamento.

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCa), estão previstos para os anos de 2008 e 2009, 49.400 novos casos de câncer de mama em mulheres brasileiras a cada ano (51 casos a cada 100 mil mulheres) (Instituto Nacional do Câncer, 2008).

O câncer de mama apresenta maior incidência e mortalidade em Estados brasileiros considerados economicamente mais desenvolvidos, em especial nas regiões Sul e Sudeste. No Rio Grande do Sul (RS), o câncer de mama é a primeira causa de óbito por câncer em mulheres, inclusive em mulheres jovens com idade entre 30-49 anos (Instituto Nacional do Câncer 2008). A capital do Estado, Porto Alegre apresenta taxas ainda mais elevadas de incidência e mortalidade por câncer de mama, especialmente na faixa etária de 50 a 69 anos (Brito *et al.* 2008).

Não existe uma explicação clara para as altas taxas de incidência e mortalidade de CM no RS, e em especial em Porto Alegre. É provável que resulte de múltiplos fatores, incluindo aspectos sociais, culturais, reprodutivos, ambientais e genéticos.

A caracterização da população quanto a fatores de risco para CM previamente descritos na literatura e o estudo de polimorfismos genéticos relacionados à doença e de interações genético-ambientais, são ferramentas fundamentais para estabelecer estratégias de prevenção e tratamento da doença.

Com base nisso, este estudo foi proposto para verificar a frequência de alguns polimorfismos em genes de baixa penetrância (polimorfismos nos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*), previamente associados à proteção ou a risco para CM, e de

fatores de risco associados à 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**

Estudos epidemiológicos indicam um aumento da incidência do CM tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, sendo as taxas de incidência mais altas nos Estados Unidos e Norte da Europa, intermediárias no Sul e Leste Europeu e Sul da América, e baixas na Ásia (Parkin *et al.* 2005). Porém, os índices de incidência continuam aumentando em países em desenvolvimento enquanto que em países desenvolvidos esses índices estão decaindo, o que pode ser explicado pela garantia de acesso à saúde e pela adoção de políticas de detecção precoce do tumor (Tavassoli *et al.* 2003).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil apresenta 169.544.443 de habitantes, entre os quais 86.120.890 (50,8%) são mulheres (IBGE 2002). Entre as mulheres, o câncer de mama é considerado a primeira causa de câncer e está associado a elevado número de óbitos em todas as faixas etárias (Instituto Nacional do Câncer 2008). A doença é muito mais freqüente em mulheres do que em homens, em uma proporção de 100 para 1. Nas mulheres, a doença geralmente é diagnosticada entre 40 e 60 anos de idade sendo estimado que uma entre cada oito mulheres irá desenvolver câncer de mama a partir dos 55 anos (Easton *et al.* 2002).

A mortalidade por CM aumentou consideravelmente em todas as regiões brasileiras nos últimos dez anos. Nas regiões Sul e Sudeste, consideradas regiões

de maior poder aquisitivo, o risco de morte por câncer de mama foi pelo menos duas vezes maior, nas décadas de 80 e 90 (Gonçalves *et al.* 2007).

Segundo estimativas do ano de 2008, também válidas como previsão para o ano de 2009, os Estados que compreendem estas regiões são os que apresentam as maiores taxas de incidência de câncer do país: Estado do Rio de Janeiro, com registro de 92.77 casos de CM a cada 100.000 mulheres, Estado do Rio Grande do Sul (RS), com registro de 85.5 casos a cada 100.000 mulheres, e pelo Estado de São Paulo (SP), com registro de 72.5 casos a cada 100.000 mulheres, respectivamente (Instituto Nacional do Câncer 2008).

O RS comparado a outros Estados do Brasil, é o que recebeu o maior número de imigrantes europeus e também o que recebeu um menor percentual de ameríndios e africanos. O RS é o estado com a maior expectativa de vida, (75,0 anos) comparada à média brasileira, que fica em torno de 72.7 anos (IBGE 2008; Gonçalves *et al.* 2007).

Ademais, o RS é um dos Estados com o maior número de trabalhadores expostos a agentes carcinogênicos, também o que apresenta 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/m<sup>2</sup>. Porto Alegre, quando comparada a outras capitais brasileiras, apresenta o maior índice de estudantes tabagistas na faixa etária entre 12 e 16 anos (Instituto Nacional do Câncer 2007).

Porto Alegre, a capital do RS, apresenta a mais alta incidência de CM do país. Foi previsto para o ano de 2008 e para o ano de 2009, 119.72 casos novos por ano a cada 100.000 mulheres, enquanto que a estimativa nacional é de 51.0 novos casos por ano a cada 100.000 mulheres (Instituto Nacional do Câncer 2008). Sendo

assim, estudos para melhorar a compreensão do comportamento biológico do câncer de mama e facilitar a identificação de pacientes em risco para esta neoplasia são de fundamental importância.

## **2.2. Genética do Câncer de Mama**

O câncer de mama resulta de alterações genéticas (mutações) em oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparo do DNA que estão envolvidos em processos que regulam funções celulares importantes como divisão celular, proliferação e apoptose (Weinberg, 2008).

Na maioria dos casos, os tumores de mama são esporádicos, ou seja, causados por mutações em uma única célula somática. Mais raramente, quando o câncer ocorre como parte de uma síndrome de câncer hereditário, as mutações iniciais causadoras do câncer ocorrem em genes de alta penetrância e são herdadas seguindo herança monogênica estando presentes na linhagem germinativa (Weinberg, 2008).

No entanto, a maioria dos casos de CM está associada a 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, não estando diretamente associados a alterações em genes de alta penetrância (Peto *et al.* 1996).

### **2.2.1. Mutações em genes de alta penetrância**

Estima-se que 5-10% de todos os casos de câncer de mama podem ser atribuídos a mutações germinativas em genes de alta penetrância, e entre estes, os mais estudados são *BRCA1* e *BRCA2* (Bennett *et al.* 1999). As proteínas *brca1* e

*brca2* atuam no controle do ciclo celular, estabilidade genética e reparo do dano do DNA. Mutações germinativas nestes genes são responsáveis por 2-5% de todos os casos de câncer de mama, sendo a frequência mais alta naquelas famílias onde há múltiplos familiares de primeiro grau afetados e diagnósticos precoces da doença (Deng 2006; Narod, 2006; Ellisen & Haber 1998).

Além de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, outros genes estão associados ao câncer de mama hereditário, incluindo o supressor tumoral *TP53*. Mutações germinativas neste gene estão associadas à Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e sua variante, Síndrome de Li-Fraumeni-*like* (LFL). Mutações em *TP53* podem também ter um papel importante na progressão tumoral, independente da predisposição, uma vez que mutações somáticas têm sido encontradas em 50% dos casos de câncer de mama esporádico (Bennett *et al.* 1999; Ellisen & Haber 1998; Greene, 1997).

### **2.2.2. Polimorfismos em genes de baixa penetrância**

Os polimorfismos genéticos são variações na seqüência de DNA caracterizados por deleções, inserções ou substituições de nucleotídeos que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição, levando a uma alteração na seqüência do DNA (Thompson & Thompson, 2002).

Estes polimorfismos ocorrem em uma frequência de pelo menos 1% da população, e podem ou não causar alterações na função do produto protéico. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer. (Miller *et al.* 2001; Wormhoudt *et al.* 1999).

Os polimorfismos, geralmente, estão associados a um risco relativo pequeno a moderado para CM e, como os estudos acerca de polimorfismos em sua maioria

utilizam pequenos números amostrais, muitos dados iniciais não são replicados. A formação de consórcios colaborativos para a realização de estudos em larga escala, é sugerida como estratégia para a replicação destas evidências de associação de genes candidatos, e a exploração das interações gene-gene e gene-ambiente (Hirschhorn & Daly, 2005; Dunning *et al.* 1999).

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

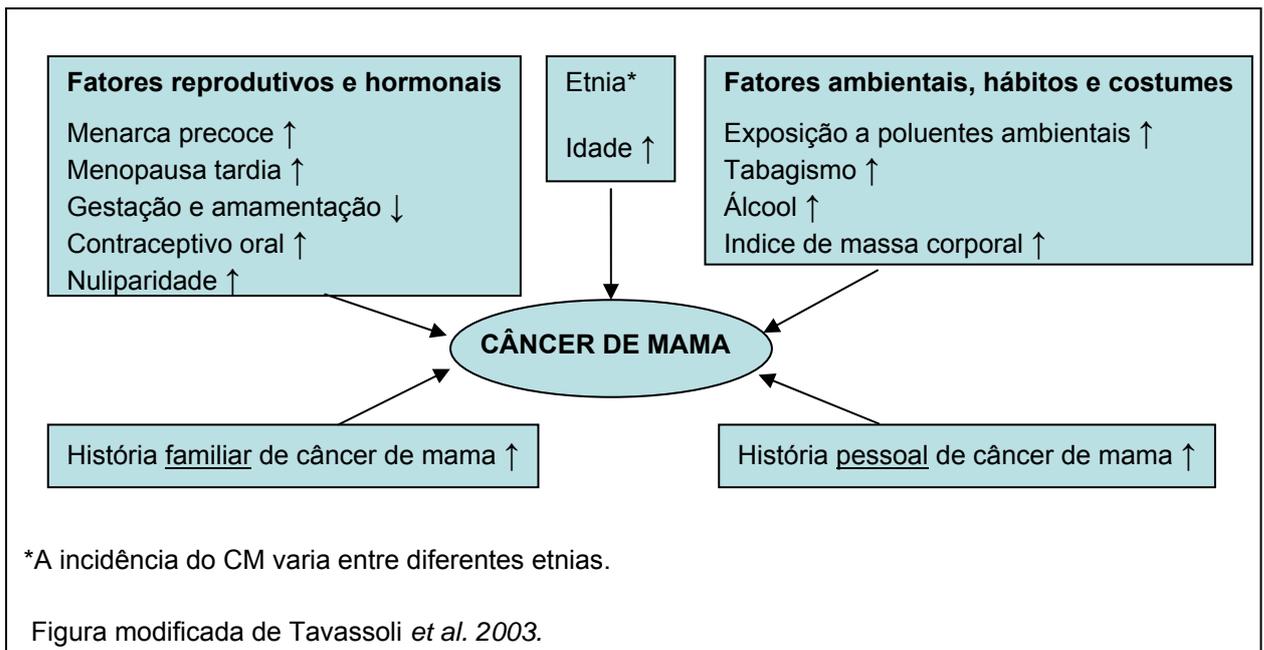
As freqüências genotípicas dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, descritas na literatura em mulheres sem CM, estão resumidos na tabela 1.

**Tabela 1. Genes de suscetibilidade ao câncer de mama e frequências genóticas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem câncer de mama.**

Gene	Localização Cromossômica	Denominação do gene	Polimorfismo	Frequências genóticas	Referências
<i>GSTP1</i> (Ile105Val) rs1695	11q13	Glutathiona S-transferase pi	<i>GSTP1 A/G*</i>	0.12 0.026 0.10	Rossini <i>et al.</i> 2002 Egan <i>et al.</i> 2004 Kvitiko <i>et al.</i> 2006
<i>GSTM1</i>	1p13.3	Glutathiona S-transferase mu	<i>GSTM1*0</i>	0.42 0.526 0.439	Rossini <i>et al.</i> 2002 Park <i>et al.</i> 2003 Gattás <i>et al.</i> 2004
<i>GSTT1</i>	22q11.2	Glutathiona S-transferase theta	<i>GSTT1*0</i>	0.25 0.419 0.195	Rossini <i>et al.</i> 2002 Park <i>et al.</i> 2003 Morais <i>et al.</i> 2008

### 2.3. Fatores de Risco para Câncer de Mama

O CM é uma doença multifatorial complexa, na qual ocorrem interações entre fatores de risco relacionados à doença, podendo ser fatores de risco de natureza genética e não-genética (fatores reprodutivos, hormonais, ambientais, hábitos e costumes), Figura 1.



**Figura 1. Fatores associados com aumento (↑) ou diminuição (↓) do risco de câncer de mama em mulheres.**

#### 2.3.1. Idade

Nas últimas décadas tem sido observado um progressivo envelhecimento populacional, tanto no Brasil quanto no mundo. Este fator pode estar associado ao aumento das taxas de incidência de câncer de mama, já que o risco para esta neoplasia 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; Curi Hallal *et al.* 2001).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2008), no Brasil mais de 80% dos casos de CM ocorrem em mulheres acima dos 50 anos e cerca de 5% dos casos ocorrem em mulheres com idade inferior a 30 anos.

### **2.3.2. Etnia**

A incidência e mortalidade por CM variam consideravelmente entre diferentes grupos étnicos e raciais, sendo maior entre os caucasianos e afro-americanos, e, intermediária entre hispânicos e ameríndios, e mais baixa entre os asiáticos.

No Brasil, a miscigenação da população provavelmente influi na incidência da doença (American Cancer Society 2007; Ghafoor *et al.* 2003; Hallal *et al.* 2001). Vários estudos sugerem que mulheres de origem judaica Ashkenazi, especialmente aquelas com história familiar: em familiares de primeiro grau de CM, apresentam quase quatro vezes mais chance de desenvolver a doença (Egan *et al.* 1996).

Smigal *et al.* (2006) em um estudo com base no registro de dados do *National Cancer Institute* e do *North American Association of Central Cancer Registries*, evidenciaram que o risco para CM aumenta em mulheres brancas com  $\geq 50$  anos de idade, quando comparadas a mulheres afro-americanas com  $\geq 50$  anos de idade e mulheres brancas com  $< 50$  anos de idade. No estudo, também foi evidenciado que em mulheres afro-americanas com  $< 50$  anos de idade o risco parece diminuir, e mulheres deste mesmo grupo com  $< 35$  anos de idade apresentam um risco mais elevado, porém discreto em relação às mulheres brancas com a mesma idade.

### **2.3.3. Fatores Reprodutivos e Hormonais**

#### **2.3.3.1. Menarca e Menopausa**

Tanto a menarca precoce (<11 anos de idade) quanto à menopausa tardia (>54 anos de idade) estão associadas a um aumento de risco para CM em duas vezes, provavelmente devido à exposição prolongada do parênquima mamário aos efeitos fisiológicos do estrógeno (Pike *et al.* 1981).

Mulheres com menarca antes dos 11 anos de idade possuem um risco cerca de 20% maior de desenvolver CM, em comparação com aquelas com mais de 14 anos de idade (Pike *et al.* 1981). Em contrapartida, a magnitude do risco atribuído à menopausa tardia em relação ao CM não foi quantificada (Robbins e Cotran 2005).

#### **2.3.3.2. Gestação**

Mulheres que tiveram a primeira gestação a termo antes dos 20 anos de idade apresentam uma redução do risco para CM em 30%, quando comparadas às mulheres que tiveram a primeira gestação a termo com 35 anos de idade ou mais (Kelsey *et al.* 1993).

Mulheres que não gestaram (nulíparas) apresentam risco igual às aquelas com nascimento do primeiro filho após os 30 anos de idade (Robbins e Cotran 2005; Harris *et al.* 1996).

### **2.3.3.3. Amamentação**

Longos períodos de amamentação reduzem o risco para CM e, segundo evidências de uma metanálise, a cada ano de amamentação efetiva, o risco relativo para a doença diminui em 4,3% (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* 1997).

### **2.3.3.4. Hormônios Exógenos**

O uso de contraceptivos hormonais está associado a um risco levemente aumentado para CM (risco relativo - RR= 1.24), mas esse risco desaparece após 10 anos da cessação de uso. Mulheres que iniciaram o uso de contraceptivos antes dos 20 anos de idade apresentam um risco ainda maior de desenvolver CM (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* 1997).

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 (RR= 1.35). Porém, o risco para CM parece não aumentar após cessação do uso de TRH, independentemente do tempo de uso no passado (Tavassoli *et al.* 2003).

## **2.3.4. Fatores Ambientais, Hábitos e Costumes**

### **2.3.4.1. Poluentes ambientais**

Os poluentes ambientais podem agir no DNA levando a efeitos teratogênicos, mutações em células germinativas, envelhecimento precoce ou induzir transformações neoplásicas em células somáticas. Muitos tipos de câncer em

humanos podem ser causados por exposição a substâncias tóxicas presentes no meio (Silva *et al.* 2003).

Efeitos genotóxicos e carcinogênicos têm sido relacionados com emissões de gases de veículos e indústrias, incineração de resíduos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) associados ao material particulado. Populações expostas por motivos ocupacionais ou habitantes de regiões altamente industrializadas podem sofrer efeitos genotóxicos (Silva *et al.* 2003).

A grande maioria dos estudos envolvendo genes de suscetibilidade e poluentes ambientais envolvem os genes de fase I da superfamília Citocromo P450 (CYP450) e os genes de fase II da superfamília glutationa S-transferases (GSTs). Estes genes atuam no metabolismo de quase todos os químicos que as populações humanas entram em contato e na detoxificação, e em poucos exemplos na ativação de muitos xenobióticos (Silva *et al.* 2003).

Rundle e colaboradores (2002), em um estudo caso-controle, encontraram associação entre a variante nula do gene de detoxificação *GSTM1* e níveis de adutos do DNA em mulheres com câncer de mama. Estes resultados sugerem que o polimorfismo *GSTM1* tem um papel na prevenção do acúmulo de danos ambientais no tecido mamário.

Outro tipo de poluente oriundo de processos industriais é constituído de bifenilas policloradas (PCBs) que também causam efeitos deletérios lentos incluindo eventos associados à genotoxicidade, carcinogênese, diminuição na atividade reprodutiva ou nascimento de indivíduos com malformações. PCBs foram usados em equipamentos elétricos até a sua produção ser proibida nos Estados Unidos na década de 70. Devido à bioacumulação em rios contaminados de áreas industriais, a fonte primária de exposição à população é a partir do peixe. PCBs se acumulam na

gordura e altos níveis têm sido encontrados no leite materno (Brody *et al.* 2007; Silva *et al.* 2003).

Helzlsouer e colaboradores (1999), em um estudo caso-controle de coorte, não mostraram efeitos modificadores de diferentes genótipos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *COMT* e *CYP17* na associação de níveis de PCBs e risco para câncer de mama.

#### **2.3.4.2. Tabagismo**

O hábito de fumar pode alterar a frequência de mutações, aproximadamente 30% dos fumantes morrem de causas diretamente relacionadas ao hábito de fumar. O tabagismo é uma das principais fontes de exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e parece estar associado com o risco de CM (Silva *et al.* 2003; Vaury *et al.* 1995).

Os resultados dos estudos que procuram uma associação do tabaco com CM são inconsistentes. Terry e colaboradores (2002) encontraram, em mulheres que apresentavam hábitos tabagistas por muitos anos, uma associação positiva, mas fraca, com o risco de desenvolver CM. Um outro estudo em que mulheres jovens apresentavam hábito tabagista durante a gravidez mostrou que estas possuem um risco maior de desenvolver CM. Estes resultados reforçam a hipótese de que o tecido mamário é particularmente susceptível a carcinógenos entre o início da puberdade e a primeira gravidez (Innes & Byers, 2001; Russo *et al.* 1982).

#### **2.3.4.3. Etilismo**

A ingestão de álcool é o fator da dieta mais consistentemente associado com CM, embora a relação observada na maioria dos estudos seja modesta. Mulheres

que consomem dois drinques por dia aumentam em 20% o risco de CM quando comparadas a mulheres que não estão expostas a esse consumo, e aquelas que consomem mais que dois drinques por dia têm um aumento de 40% no risco. Esses estudos foram conduzidos em diversas populações, e na maioria delas, sugerem que o consumo moderado de álcool aumenta o risco de CM em mulheres na pós-menopausa (Lew *et al.* 2009; Adami *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2007).

Nos estudos em que vários tipos de álcool foram analisados – cerveja, vinho e destilados – encontrou-se associação positiva de todos com risco de CM, sugerindo que a associação é devido ao álcool em si, existindo uma relação direta entre dose e efeito (Smigal *et al.* 2006).

Muitos mecanismos biológicos são propostos para esta associação, incluindo um aumento nos níveis de hormônios circulantes, um efeito carcinogênico direto dos metabólitos do álcool – acetilaldeído, um conhecido mutagênico – e um efeito antagonista no metabolismo e na absorção do folato (Willett 2001; Zhang *et al.* 1999).

Suzuki e colaboradores (2005) encontraram associação entre ingestão de álcool e tumores de mama positivos para receptores de estrógeno, mas não para tumores estrógeno-negativos.

#### **2.3.4.4. Índice de Massa Corporal**

A relação entre o índice de massa corporal (IMC) e o risco para CM é complexa e varia de acordo com o status da menopausa. O IMC está positivamente relacionado a CM pós-menopáusicas, embora a magnitude da relação seja modesta e varie substancialmente entre os estudos (Hunter & Willett, 1993).

O mecanismo que explica este aumento do risco está provavelmente relacionado ao aumento de níveis circulantes de hormônios. Depois da menopausa, estrógenos plasmáticos são derivados primariamente de tecido adiposo, o qual tem uma relação linear entre IMC e níveis de estrógenos. Mulheres com sobrepeso (IMC = 25.1 a 29.9 kg/m<sup>2</sup>) têm níveis baixos de globulina ligante a hormônio sexual, portanto níveis mais altos de estrógenos biologicamente disponíveis (Adami *et al.* 2008).

A associação entre IMC e câncer de mama é mais forte entre mulheres que nunca fizeram terapia de reposição hormonal na pós-menopausa, sugerindo que o sobrepeso está associado com a elevação na produção de estrógeno endógeno (*International Agency for Research on Cancer*, 2002).

Segundo Huang e colaboradores (1997) mulheres obesas (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) têm um risco relativo de 1.6 para desenvolver CM comparado aquelas com IMC de 20 kg/m<sup>2</sup> ou menos. Assim como, aquelas que ganharam 20 kg ou mais a partir dos 18 anos de idade, possuem um risco relativo de 2.0 comparadas a mulheres que mantiveram seu peso estável.

### **2.3.5. História Pessoal de Câncer de Mama**

Mulheres que já apresentaram CM possuem um risco aumentado de desenvolver a doença na outra mama de 1% a cada ano, e o risco do desenvolvimento de uma segunda neoplasia é 5 vezes superior ao da população geral (Sakorafas *et al.* 2002, Chen *et al.* 1999).

### **2.3.6. História Familiar de Câncer de Mama**

A história familiar é um importante fator de risco para o câncer de mama, especialmente se um ou mais familiares de primeiro grau foram diagnosticadas antes dos 50 anos de idade. Mulheres com história familiar de CM possuem um risco duas vezes maior que mulheres que não possuem pessoas afetadas na família (Barros *et al.* 2001; Chen *et al.* 1999).

Entretanto, o câncer de mama de caráter hereditário corresponde a aproximadamente 5-10% do total de casos, e decorre da presença de mutações em genes de predisposição na linhagem germinativa. É importante ressaltar que 85% das mulheres com familiares de primeiro grau não desenvolvem a doença e aproximadamente 85% das mulheres com CM não têm história familiar da doença (Friedenrich *et al.* 2001; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2001).

### **2.4. Modelos de Estimativa para Câncer de Mama**

Os modelos de estimativa, são modelos criados, para quantificar de forma mais clara o risco de uma mulher assintomática desenvolver CM ao longo da vida, direcionando ações que servem tanto na prevenção primária quanto na secundária ao câncer. A Tabela 2 descreve as variáveis utilizadas em três modelos (Gail, Claus e Tyrer-Cuzick) capazes de predizer o risco para câncer de mama em mulheres.

#### **2.4.1. 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).

As variáveis utilizadas no cálculo do Modelo de Gail são: idade atual da paciente, etnia, 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).

#### **2.4.2. Modelo de Claus**

O modelo de Claus 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, acometidas pela doença e a idade desses quando diagnosticados com CM (Claus *et al.* 1994).

#### **2.4.3. Modelo de Tyrer-Cuzick**

O modelo de Tyrer-Cuzick 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. (Tyrer *et al.* 2004).

**Tabela 2. Variáveis utilizadas para estimar o risco de desenvolver câncer de mama nos Modelos de Gail, Claus e Tyrer-Cuzick.**

<b>Variável</b>	<b>Gail</b>	<b>Claus</b>	<b>Tyrer-Cuzick</b>
<b>Informações pessoais</b>			
Idade	X	X	X
Etnia	X		
IMC			X
<b>História reprodutiva</b>			
Menarca	X		X
Nascimento 1° filho	X		X
Menopausa			X
<b>Doença mamária</b>			
Biópsia de mama	X		X
Hiperplasia atípica	X		X
Carcinoma ductal <i>in situ</i>			X
<b>História familiar de câncer de mama</b>			
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 Laloo *et al.* 2005

## 2.5. Rastreamento do Câncer de Mama

A prevenção do CM possui como objetivo diminuir a incidência da doença em uma população, reduzindo o surgimento de casos novos, prevenindo a exposição aos fatores que levam ao seu desenvolvimento, interrompendo seus efeitos ou alterando as respostas dos indivíduos a essa exposição, impedindo que ocorra seu início biológico. Ou também atuando com finalidade de alterar o curso da doença por meio de intervenções que permitam sua detecção precoce e tratamento oportuno, uma vez que seu início biológico já aconteceu (Barra *et al.* 2004; Thuler, 2003).

No que se refere ao CM, torna-se difícil à prevenção primária uma vez que não é possível reconhecer com precisão o fator precursor da doença, embora estudos observacionais tenham sugerido que a prevenção ao tabagismo, alcoolismo, obesidade e sedentarismo reduzam o risco de câncer de mama (Instituto Nacional do Câncer 2007; Monteiro *et al.* 2003).

No Brasil, todos os registros disponíveis mostram que as mulheres procuram o tratamento para câncer de mama já em estágios avançados da doença, com poucas chances de tratamento não mutilante ou para cura desta neoplasia maligna. Para a solução deste problema são necessárias ações de caráter educativo associadas ao uso difundido e acesso igualitário a técnicas que possibilitem o diagnóstico precoce do câncer de mama (Peixoto *et al.* 1999).

A detecção precoce torna-se possível por meio de rastreamento, ou seja, exame das pessoas assintomáticas a fim de se identificar aquelas com maiores chances de desenvolvê-la. Este rastreamento pode ser realizado por diferentes estratégias, incluindo auto-exame da mama, exame clínico da mama, mamografia e ecografia mamária. Para que o CM seja identificado precocemente é essencial educar a população e os profissionais de saúde no sentido de perceberem os sinais

e sintomas precoces do câncer, contribuindo para sua detecção em estágios menos avançados e aumentando as chances de sucesso do tratamento (Barra *et al.* 2004; Thuler, 2003; Santos & Neto 1998).

### 2.5.1. Densidade Mamária e BI-RADS

A densidade mamária é uma característica da glândula mamária identificada na imagem da mamografia. Mamas extremamente densas, ou seja, com predomínio de tecido fibroglandular correspondente BI-RADS 4, estão relacionadas a alto risco de câncer mamário (Chen *et al.* 2006b, Palomares *et al.* 2006, Vacek *et al.* 2004; Harvey e Bovbjerg, 2004).

O *BIRADS* é um sistema desenvolvido para classificação das imagens de mamografia. O sistema *BIRADS* está detalhado na Tabela 3.

**Tabela 3. Classificação de exame de mamografia pelo Sistema BIRADS.**

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
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

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 4.

**Tabela 4. Categorias de densidade da mama.**

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Componente Fibroglandular (%)</b>
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

Entretanto, apesar da densidade mamária ser um fator de risco forte para câncer de mama, não está claro se a redução da densidade diminuiria o risco para a doença (Barlow *et al.* 2006).

Alguns estudos têm verificado a relação do modelo de Gail com a densidade mamográfica. Weik *et al.* (2005) descreveram que mulheres com maior risco de desenvolver CM, definidas como tendo risco atual  $\geq 1.67\%$  (pelo modelo de Gail), tiveram duas vezes maior a taxa de malignidade do que naquelas com baixo risco de desenvolver CM. A maioria dessas mulheres tinham BI-RADS 4 e, quando submetidas à biópsia, tiveram achados malignos.

Alguns autores propuseram a criação de modelos de cálculo de risco que aliem densidade mamária aos fatores de risco conhecidos há mais tempo, como os descritos por Gail, com o propósito de melhorar a acurácia da avaliação (Barlow *et al.* 2006; Santen, 2007; Tice *et al.* 2005; Bondy e Newmann, 2006).

## **2.6. Xenobióticos e sua metabolização no organismo**

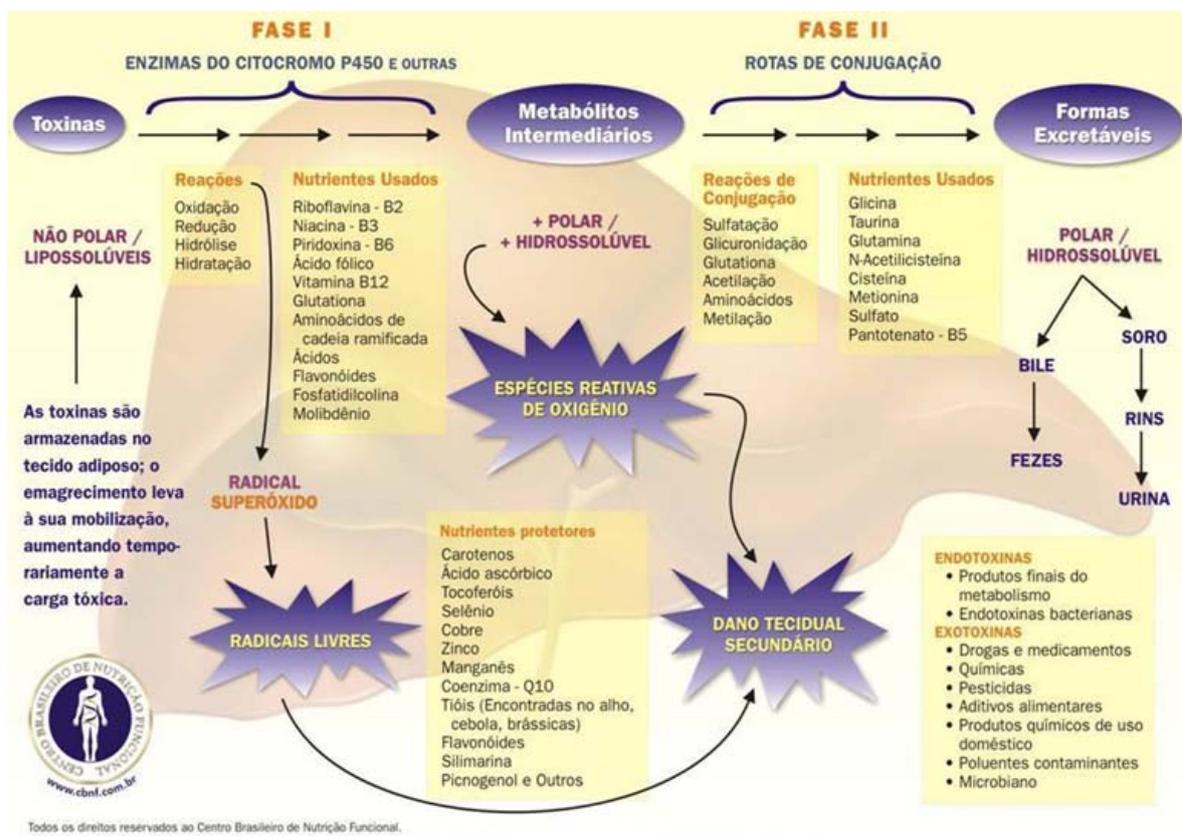
O organismo humano é exposto diariamente a centenas de compostos químicos exógenos, também denominados xenobióticos, tais como suplementos alimentares, fármacos, pesticidas e outros poluentes do meio ambiente. A biotransformação destes xenobióticos através de enzimas específicas facilita sua eliminação do corpo. O fígado é o principal órgão envolvido nesse processo, contudo pode ocorrer em menor grau no intestino, pulmão, rim, e outros (Silva *et al.* 2003).

O sistema de metabolização xenobiótica humano compreende duas classes de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de fase I e as enzimas conjugadas ou de fase II (Figura 2). O objetivo de ambas as fases é aumentar a solubilidade em água dos compostos facilitando assim sua excreção do organismo (Shimada e Fujii-kuriyama, 2004; Nebert, 1991).

As principais enzimas de fase I são da superfamília do citocromo P 450 (CYP-450) que são as principais enzimas na ativação metabólica dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), que são alguns dos principais carcinógenos encontrados no meio ambiente (Shimada e Fujii-kuriyama, 2004).

As reações de fase II ocorrem através das enzimas detoxificadoras da família da glutathione S-transferases (GSTs) e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção, completando o ciclo de detoxificação, impedindo que o acúmulo dessas substâncias tóxicas interajam com o DNA (Rossit *et al.* 1999; Nebert, 1991).

Figura 2. Interação entre as Enzimas metabolizadoras de Fase I e Fase II, e como elas contribuem para toxicidade, mutação e câncer.



Dunning e colaboradores (1999) consideraram que enzimas cuja função é proteger o organismo da ação tóxica de xenobióticos, aumentam a toxicidade dos mesmos em algumas situações, consequentemente aumentando o risco de câncer. Sendo assim, os genótipos que conferem variações nos níveis de atividade enzimática estão associados à susceptibilidade individual ao desenvolvimento de câncer.

As ações das enzimas de fase I e II tornam os compostos mais solúveis, acelerando o processo de excreção. O equilíbrio entre essas enzimas que aumentam a toxicidade ou inativam os produtos químicos pode conferir uma sensibilidade individual diferenciada, devendo diminuir o risco de câncer (Rossit *et al.* 1999).

Entretanto, alguns indivíduos ou populações de diferentes etnias, podem apresentar risco significativamente maior de desenvolver câncer quimicamente induzido, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e detoxificação. Muitos genes envolvidos nesses processos são conhecidos pelos seus polimorfismos, e muitos tem sido associados a maior susceptibilidade a diversos tipos de câncer (Caporaso, 1999; Nebert *et al.* 1997).

## **2.7. Polimorfismos Genéticos associados ao Câncer de Mama: Genes que codificam enzimas de biotransformação**

### **2.7.1. Genes de fase II: família glutathiona-s transferase**

As glutathionas S-transferases (GSTs) são enzimas de fase II que possuem como função básica a detoxificação, mediando a conjugação de um grande número de compostos eletrofílicos. Essa conjugação facilita a remoção de toxinas e protege a célula dos efeitos tóxicos dos xenobióticos (Egan *et al.* 2004; Amorim *et al.* 2002).

Estas enzimas possuem a capacidade de detoxificação do metabolismo celular, tanto pela conjugação com as glutathionas como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas como os PAHs presentes na dieta alimentar e na fumaça do cigarro (Landi, 2000).

Além disso, as GSTs têm um importante papel no metabolismo do estrogênio, agindo na metabolização de esteróides e radicais livres que podem ser indiretamente produzidos pelo metabolismo do estrogênio. Ao reduzir a genotoxicidade, pode haver uma modificação do risco de desenvolver CM relacionado ao estrogênio (Park *et al.* 2003; Cavalieri *et al.* 1997).

As enzimas da grande família das glutionas s-transferases são classificadas em sete tipos de isoenzimas: alpha ( $\alpha$ ), mu ( $\mu$ ), pi ( $\rho$ ), sigma ( $\sigma$ ), theta ( $\theta$ ), Kappa ( $\kappa$ ) e zeta ( $z$ ), sendo que a expressão das classes mu e pi predominam em células mamárias (Egan *et al.* 2004; Landi, 2000).

Em estudos de população e de suscetibilidade às doenças ambientais, os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* vêm sendo freqüentemente analisados e desta análise possivelmente surgirão informações para a prevenção, diagnóstico e tratamento de problemas de saúde humana (Silva *et al.* 2003).

#### **2.7.1.1. Gene *GSTM1***

O gene *GSTM1*, localiza-se no cromossomo 1p13.3 e é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais (*GSTM1\*A* e *GSTM1\*B*) e um alelo com atividade nula (*GSTM1\*0*). Indivíduos com pelo menos um dos alelos funcionais são chamados *GSTM1*-positivos e heterozigotos apresentam a mesma eficiência metabólica de homozigotos *GSTM1*-positivos. Os indivíduos portadores da deleção de 215 pares de base em ambos alelos deste gene são chamados *GSTM1*-nulos (Gattás *et al.* 2004; Roodi *et al.* 2004).

Indivíduos *GSTM1*-nulos exibem ausência da atividade enzimática e sugere-se que possuam um risco aumentado para efeitos de uma grande variedade de carcinógenos ambientais (Millikan *et al.* 2000).

A freqüência de indivíduos homozigotos para os alelos nulos do gene *GSTM1* é bastante alta nas diversas populações humanas, variando de 20% na África à 100% na Oceania (Garte *et al.* 2001; Rebbeck, 1997).

Em alguns estudos realizados em populações brasileiras as freqüências do genótipo nulo foram de 55% (Arruda *et al.* 1998), 60,2% (Gattás e Soares-Vieira,

2000), 48,9% (Rossini *et al.* 2002) e 55,4% (Gattás *et al.* 2004) em amostras populacionais dos estados da Amazônia, Bahia e São Paulo; de São Paulo; do Rio de Janeiro; e da Bahia e São Paulo, respectivamente. Em uma amostra de brasileiros residentes no RS e descendentes de europeus e africanos, a frequência encontrada foi de 34% e 50% respectivamente (Kvitko *et al.* 2006; Gaspar *et al.* 2004).

Helzlsouer e colaboradores (1998) evidenciaram associação entre o genótipo nulo e o risco de desenvolvimento de câncer de mama pós-menopausa (OR=2.5). Em um estudo de metanálise foi relatado um aumento de 20-50% de risco de CM em mulheres *GSTM1*-nulas (Egan *et al.* 2004).

#### **2.7.1.2. Gene *GSTT1***

O gene *GSTT1* localiza-se no cromossomo 22q11.2, e também é bem polimórfico na população humana. Uma deleção de 480 pares de bases foi descrita neste gene e resulta na inatividade completa da enzima. Indivíduos com pelo menos um dos alelos funcionais são chamados *GSTT1*-positivos e apresentam a mesma eficiência metabólica, porém os indivíduos portadores da deleção em homozigose são chamados *GSTT1*-nulos (Pemble *et al.* 1994).

As frequências do *GSTT1*-nulo são menores do que as descritas para o *GSTM1*-nulo. Há evidências de que a única exceção ocorra em asiáticos, que apresentam uma maior frequência do genótipo *GSTT1*-nulo, variando de 46 a 58% em chineses e de 42 a 46% em coreanos (Geisler e Olshan, 2001).

Gattás e colaboradores (2004) descreveram as frequências do genótipo *GSTT1*-nulo em amostras da população brasileira e as frequências verificadas foram de 26,3% em negros, 22,3% em brancos e 17,2% em mulatos. Outros estudos

realizados na população brasileira com descendentes de europeus e afro-descendentes no Rio Grande do Sul encontraram freqüências de 28% e 21,1% respectivamente (Kvitko *et al.* 2006; Gaspar *et al.* 2004).

O genótipo nulo *GSTT1* foi associado a um aumento da suscetibilidade individual ao câncer (Norppa *et al.* 1995). Chen e colaboradores (1996) descreveram um método para a caracterização simultânea dos alelos *GSTM1* e *GSTT1* e estudaram os genótipos em afro-descendentes e caucasóides. A freqüência do genótipo *GSTM1*-nulo foi maior em brancos e do *GSTT1*-nulo foi maior em afro-descendentes; não houve diferença significativa de freqüência do genótipo duplo-nulo entre os grupos estudados.

Os genótipos *GSTM1/GSTT1* nulos foram positivamente associados com CM em mulheres com história familiar de CM (OR=2.1) e (OR=1.9) respectivamente (Millikan *et al.* 2000).

### **2.7.1.3. Gene *GSTP1***

O gene *GSTP1* localiza-se no cromossomo 11q13 e codifica a enzima *gstp1*, envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos de alguns PAHs. Dois polimorfismos foram descritos para esse gene: um no códon 105 (exon 5), que resulta na mudança do aminoácido Ile→Val e outro no códon 114 (exon 6), com alteração de Ala→Val. A mutação valina 105 (\*Ile105Val, rs 1695) ocorre na região correspondente ao centro catalítico da enzima e resulta em redução importante na atividade enzimática (Dusinská *et al.* 2001; Ali-Osman *et al.* 1997).

Vários estudos demonstram que as isoformas de *GSTP1* apresentam diferenças na especificidade de ligação ao substrato e na estabilidade térmica

conferindo diferentes atividades catalíticas, e que podem afetar diferentemente a susceptibilidade ao câncer (Ali-Osman *et al.* 1997; Harries *et al.* 1997).

Rossini e colaboradores (2002), analisando uma amostra do Rio de Janeiro, descreveram a distribuição genotípica do alelo mutante e encontraram os seguintes genótipos com suas respectivas frequências: 49,7% para Ile/Ile, 38,1% para Ile/Val e 12,2% para Val/Val. Em um estudo feito no Rio Grande do Sul, com uma amostra de brasileiros descendentes de europeus, a distribuição genotípica do Ile105Val em *GSTP1* foi de 52,2% para Ile/Ile, 40,0% para Ile/Val e 7,8% para Val/Val. E em uma amostra de afro-descendentes residentes na mesma área geográfica, a distribuição genotípica do *GSTP1* foi de 29,0% para Ile/Ile, 58,0% para Ile/Val e 13,0% para Val/Val (Kvitko *et al.* 2006).

### **3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

#### **3.1. Justificativa**

O CM é um problema significativo de saúde pública, devido às suas altas taxas de incidência e mortalidade crescentes no Brasil. O problema é particularmente relevante no Rio Grande do Sul, e em Porto Alegre, onde se registram elevada morbi-mortalidade associada à doença e altos custos de tratamento.

Dessa forma, aprimoramento do conhecimento acerca de alterações em genes de suscetibilidade relacionados a risco e proteção para o desenvolvimento da doença é importante 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) poderão auxiliar no entendimento do perfil epidemiológico e dos 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 *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, correlacionando os achados moleculares com fatores de risco para CM.

### **3.2.2. Específicos**

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

3.2.2.2. Comparar as frequências gênicas, e genóticas 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 *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, com outros fatores de risco previamente descritos na literatura: idade na menarca, idade na menopausa, índice de massa corporal, densidade mamária e resultado da mamografia.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D. Textbook of Cancer Epidemiology, 2ª ed, Oxford, University press: 2008.

Ali-Osman, F, Akande O, Antoun G, *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase pi gene variants. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:10004–10012.

American Cancer Society (2007). <http://www.cancer.org>. Acessado em Março de 2009.

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

Amorim LMF, Rossini A, Mendonça G, *et al.* CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.* 2002; 181 (2): 179-186.

Arruda VR, Grignolli CE, Gonçalves MS, *et al.* Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin. Genet.* 1998; 54: 210-214.

Barlow WE, White E, Ballard-Barbash R, *et al.* Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. *Journal of the National Cancer Institute.* 2006. Vol. 98(17): 1204-1214.

Barros ACSD, Barbosa EM, Gebrim LH. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 1 ed. São Paulo: AMB-CFM, 2001.

Barra AA, Lucena CEM, Lages AF, *et al.* Controvérsias no Rastreamento do Câncer de Mama. *Femina.* 2004; 32(9): 751-7.

Bennett I, Gattas M, Teh B. The genetic basis of breast cancer and its clinical implications. *Aust N Z J Surg* 1999; 69:95-105.

Bondy ML, Newmann LA. Assessing breast cancer risk: evolution of the Gail model. *Journal of the National Cancer Institute.* 2006. Vol. 98(17): 1172-1173.

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.

Brody JG, Moysich KB, Humblet O, *et al.* Environmental Pollutants and Breast Câncer. *American Cancer Society.* 2007; June 15, Vol 109, Number 12: 2667-2711.

Cavenee WK e White RL. The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* 1996; 272: 72-796.

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

Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics.* 1996; 187-191.

Chen WY, Manson JE, Hankinson SE, *et al.* Unopposed estrogen therapy and the risk of invasive breast cancer. *Archives of Internal Medicine.* 2006b. Vol. 166: 1027-1032.

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.

Caporaso N. Selection of candidate genes for population studies. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. *IARC Scientific publications.* Lyons. 1999; 148: 23-36.

Cavaliere EL, Stack DE, Debanesan PD, *et al.* Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 10937-10942.

Curi Hallal AL, Gotlieb SLD, Latorre MRDO. Evolução da mortalidade por neoplasias malignas no Rio Grande do Sul, 1979-1995. *Rev Bras Epidemiol.* 2001; 4: 169-77.

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

Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:1416-26.

Dusinská M, Ficek A, Horska A, *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat. Res.* 2001; 482: 47-55, 2001.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, *et al.* A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8:843-54.

Easton DF. Familiar risks of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002; v. 4, n. 5, p.179-81.

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

Egan KM, Cai Q, Shu X, *et al.* Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the risk for breast cancer: results from the Shanghai breast cancer study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2004; 13: 197-204.

Ellisen LW ,Haber DA. *Hereditary breast cancer.* Annu Rev Méd. 1998;49:425-36.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, *et al.* Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001; 10: 1239-1248.

Friedenreich CM, Courneya KS, Bryant HE. Summary Report: review of lifestyle and environmental risk factors for breast cancer. *Canadian Breast Cancer Initiative*, 2001.

Gaspar PA, Moreira J, Kvitko K, *et al.* CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: Do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and nonsmall- cell lung cancer? *Genet Mol Biol.* 2004; 27:133-138.

Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, *et al.* Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37: 451-458.

Gattás GJF, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup. Med.* 2000; 50 (7): 508-511.

Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am. J. Epidemiol.* 2001; 154: 95-105.

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.

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.

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 MH. *Genetics of breast cancer.* Mayo Clin Proc 1997;72:54-65.

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.

Harvey JA, Bovbjerg VE. Quantitative assessment of mammographic breast density: relationship with breast cancer risk. *Radiology*. 2004. Vol.230: 29-41.

Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, *et al*. Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase P locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 641-644.

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

Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Huang HY, *et al*. Serum concentrations of organochlorine compounds and the subsequent development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999; 8:525-532.

Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-Wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005; 6:95-108.

Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, *et al*. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA* 1997; 278:1407-11.

Hunter DJ, Willett WC. Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:110-32.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Diretoria de Pesquisa. Departamento de População e Indicadores Sociais. População residente - Censo 2000: Brasil, unidades da federação e municípios, 2000. <http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000>; Acessado em março de 2009.

Innes KE, Byers TE. Smoking during pregnancy and breast cancer risk in very young women (United States). *Cancer Causes Control*. 2001; 12: 179-185.

International Agency for Research on Cancer. IARC Handbooks of Cancer Prevention Vol.6: Weight Control and Physical Activity. IARC Press: Lyon. 2002

Instituto Nacional do Câncer (INCa). <http://www.inca.gov.br>. Acessado em Março de 2009.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer no Brasil: 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>. Acessado em Março de 2009.

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.

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:36-47.

Kvitko K, Gaspar PA, Torres MR, *et al.* CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology* 2006; 29, 4, 613-616.

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

Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review. *Mutat. Res.* 2000; 463: 247-283.

Lew JQ, Freedman ND, Leitzmann MF, *et al.* Alcohol and Risk of Breast Cancer by Histologic Type and Hormone Receptor Status in Postmenopausal Women. *Am J Epidemiol* 2009;170:308–317.

Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*. V.120, p. 269-280, 2001.

Millikan R, Pittman G, Tse C, *et al.* Savitz DA, Newman B, Bell D. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2000; 9: 567-573.

Monteiro APS, Arraes EPP, Pontes LB, *et al.* Auto-exame das mamas: frequência do conhecimento, prática e fatores associados. *RBGO* 2003 abril; 25(3): 201-05.

Morais LMTS, Filho CC, Lourenço GJ, *et al.* Características Mamográficas Do Câncer De Mama Associadas aos Polimorfismos GSTM1 e GSTT1, *Revista Assoc Méd Bras* 2008; 54 (1): 61-6.

Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene* 2006; 25:5832-36.

Nebert DW. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat. Res.* 1991; 247: 267-281.

Nebert DW, Mckinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.* 1997; 15: 273-280.

Norppa H, Hirvonen A, Ojajäventaus H, *et al.* Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 1995; 16: 1261-1264.

Organização Mundial da Saúde. <http://www.oms.com>. Acessado em Março de 2009.

Palomares MR, Machia JR, Lehman CD, *et al.* Mammographic density correlation with Gail model breast cancer risk estimates and component risk factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2006. Vol. 15(7); 1324-1330.

Park SK, Kang D, Noh DY, *et al.* Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003; 78: 89-96.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2):74-108.

Peixoto JE, Koch HA, Neves ALE. *Avaliação do impacto do Programa de Certificação da Qualidade em Mamografia do Colégio Brasileiro de Radiologia.* *Radiol Bras* 1999; 32:301-8.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, *et al.* Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* 1994; 300: 271-276.

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.

Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol., Biom. and Prevent.* 1997; 6: 733-743.

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

Robbins, Cotran (2005) *Patologia.* Cap23, 7º ed, Rio Janeiro, Editora Elsevier.

Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, *et al.* Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. and Mol. Res.* 2002; 1 (3): 233-240.

Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT. Avaliação das freqüências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genetics and Molecular Biology*, v.22 (Suppl.), 1999.

Roodi N, Dupont WD, Moore JH, *et al.* Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Res.* 2004; 64: 1233-1236.

Rundle A, Tang D, Hibshoosh H, *et al.* Molecular epidemiologic studies of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and breast cancer. *Environ Mol Mutagen.* 2002; 39:201-207.

Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer. Res Treat.* 1982; 2:5-73.

Sakorafas GH, Krespis E, Pavlakis G. Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. *Surgical Oncology* 2002; 10: 183–192.

Santos CC, Neto AMP. O Papel da Mamografia no Diagnóstico do Câncer de Mama Inicial em Mulheres Menores de 50 anos. *Femina.* 1998; 26(1): 23-7.

Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 2004; 95 (1): 1-6.

Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, *et al.* Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance; 2003.

Smigal C, Jemal A, Ward E, *et al.* Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; v.56, n.3, p.168-183.

Suzuki R, Ye W, Rylander-Rudqvist T, *et al.* Alcohol and Postmenopausal Breast Cancer Risk Defined by Estrogen and Progesterone Receptor Status: A Prospective Cohort Study. *Journal of the National Cancer Institute.* 2005; November 2; Vol. 97, No. 21.

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.

Terry P, Miller A, Rohan T. Cigarette smoking and breast cancer risk: a long latency period? *Int. J. Cancer.* 2002; 100: 723-728.

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.

Thuler LC. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. *Rev Bras Cancerol.* 2003; 49(4): 227-38.

Thompson & Thompson. Genética Médica – 6ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. Pág. 76-82; 2002.

Weik JL, Lum SS, Esquivel PA, *et al.* The Gail model predicts breast cancer in women with suspicious radiographic lesions. *The American Journal of Surgery.* 2005. Vol. 190: 526-529.

Weinberg, RA. A BIOLOGIA DO CÂNCER. 1ª ed, Porto Alegre, Editora Artmed. 2008.

Willett WC. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Jan;10(1):3-8; 2001.

Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochromeP450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critic Rev Toxicol.* 1999; 29:59-124.

Vaury C, Laine R, Noguez P, *et al.* Human glutathione S-transferase CYP1A1\*2A null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. *Cancer Res.* 1995; 55: 5520-5523.

Zhang S, Hunter DJ, Forman MR, *et al.* Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999a; 91:547-56.

Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, *et al.* A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *JAMA.* 1999b; 281:1632-37.

Zhang SM, Lee I-M, Manson JE, *et al.* Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk in the Women's Health Study. *Am J Epidemiol.* 2007; 165:667–676.

## 5. MANUSCRITO

**Será submetido à revista CLIMACTERIC.**

*GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic findings in women submitted to breast cancer screening.

Ernestina Aguiar<sup>1,2</sup>, Juliana Giacomazzi<sup>1-3</sup>, Aishameriane Venes Schmidt<sup>4</sup>, Hugo Bock<sup>1,5</sup>, Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>5-8</sup>, Lavinia Schüller-Faccini<sup>8-10</sup>, Dakir Duarte Filho<sup>3</sup>, Pollyanna Almeida<sup>10</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,5,6,9,10</sup>, Maira Caleffi<sup>3</sup>, Suzi Alves Camey<sup>11</sup>, Patrícia Ashton-Prolla<sup>1-3,8-10</sup>

- (1) Program of Post-Graduation in Medicine: Medical Sciences; Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (2) Genomic Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
- (3) Núcleo Mama Porto Alegre, Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil
- (4) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- (5) Genetic Identification Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
- (6) Program of Post-Graduation in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- (7) Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
- (8) Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
- (9) Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (10) Program of Post-Graduation in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.
- (11) Department of Statistics, Institute of Mathematics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

**Key words:** Breast cancer. Risk factors. Glutathione S-transferase. *GSTM1*. *GSTT1*. *GSTP1*.

### **CORRESPONDING AUTHOR**

Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD

Department of Genetics – UFRGS and

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 3359-8011 / Fax: + 55 51 3359-8010

## **ABSTRACT:**

Genetic polymorphisms in genes related to the metabolism of xenobiotics, such as genes of the superfamily of glutathione S-transferases (*GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*) have been associated with an increased risk for breast cancer (BC). Considering the high incidence of BC in the city of Porto Alegre in southern Brazil, the purpose of this study is to characterize women regarding genotypic and allelic frequencies of polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*, and correlating these molecular findings with risk factors for breast cancer in a sample consisting of 750 asymptomatic women submitted to mammographic screening. The molecular tests were performed using multiplex polymerase chain reaction (PCR) for *GSTM1* and *GSTT1*, and quantitative PCR for *GSTP1*. Clinical information was obtained from review of medical records. Overall, the frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes were 0.45 and 0.21, respectively. For the *GSTP1* polymorphism, genotypic frequencies were 0.44 for the Ile/Ile genotype, 0.44 for the Ile/Val genotype, and 0.12 for Val/Val genotype, with a frequency of 0.659 for the wildtype allele in this population, similar to results of other international publications. There was an association between the combined *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes (T-/M-) and mammographic images classified as BIRADS 3 and 4 ( $p=0.013$ ) in premenopausal women and with increased mammographic density ( $p=0.040$ ) in postmenopausal women. When analysed isolately, the *GSTT1* null (T-) genotype was also strongly associated with increased mammographic density ( $p=0.006$ ) in postmenopausal women. These findings suggest an association of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes with mammographic density in post-menopausal women.

## INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the second most common type of malignant neoplasm in the world and first among women<sup>1</sup>. In Brazil, breast cancer is a significant public health problem due to its morbidity and high rates of incidence and mortality, representing the leading cause of cancer-related deaths in Brazilian women of all ages. The state of Rio Grande do Sul (RS), for reasons still unknown, has one of the highest rates of incidence and mortality from breast cancer in Brazil. In this state, breast cancer is the leading cause of all deaths among young women (30-49 years of age)<sup>2</sup>.

Epidemiological studies suggest that environmental carcinogens should contribute to this increase<sup>3,4</sup> and that genetic differences in the metabolism of those carcinogens may be associated with individual variations in susceptibility to breast cancer<sup>5</sup>.

Genes involved in the metabolism of carcinogens can be used as markers of individual susceptibility to cancer. Their products, detoxicating enzymes, may exacerbate or suppress the activity of xenobiotics<sup>6,7</sup>. Thus, changes in the balance between activation and detoxification of carcinogens may explain the individual variations in response to exposure to these agents<sup>8,9</sup>.

Among the genes that are distinguished by their possible role in detoxification are the family of enzymes glutathione S-transferases (GST) involved in phase II of biotransformation, acting on carcinogens, environmental pollutants, drugs, and other xenobiotics. Therefore, there are several evidences that indicate a significant effect on an organism's tolerance to carcinogens when there is deficiency of specific isozymes of this family<sup>10,11</sup>. The three major genes of the GST family are *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*<sup>12</sup>. The *GSTM1* gene is located on chromosome 1p13.3, and

20% to 50% of the population has homozygous deletion of the gene, not expressing the enzyme<sup>13,14</sup>. *GSTM1* is involved in the detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons and other carcinogens, and the cells of individuals with *GSTM1* null genotypes are more susceptible to damage to DNA caused by these agents<sup>15</sup>. The *GSTT1* gene is located on chromosome 22q11.2, and it is also polymorphic in the population, with allele frequencies of zero ranging between 20 and 60% in different human populations<sup>16</sup>. The *GSTP1* gene is located on chromosome 11q13, and the presence of a polymorphism at codon 105 (substitution of isoleucine for valine, rs1695) seems to result in the reduction of the activity of the *GSTP1* enzyme<sup>16,17</sup>.

The *GSTM1* and *GSTT1* null polymorphisms (T-M-) and *GSTP1* Ile105Val have been associated with increased susceptibility to various forms of cancer, particularly those related to tobacco use and breast cancer<sup>15,18,19,20</sup>. There is little local data on the prevalence of these polymorphisms in a region with high incidence and mortality rates for breast cancer.

The purpose of this study was to determine the frequency of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a sample of women submitted to mammographic screening routine, and correlate the presence of these polymorphisms with risk factors for BC.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Population in Study**

This study comprised a group of 750 women not affected by breast cancer, between the ages of 40-69 years, participating in a population program of mammographic screening in the city of Porto Alegre, the *Núcleo Mama Porto Alegre* (NMPOA)<sup>21</sup>. The invitation to participate in the study was given to a consecutive

sample of women participating in the mammographic screening program in the cohort, during their visits to perform mammograms in a period of five months.

### **Collection of Clinical Data and Risk Factors**

The clinical information and the information on risk factors for breast cancer of the participants were gathered from anamnesis sheets and medical history. An estimative of the vital risk of developing breast cancer was done for all women through the Gail model<sup>22</sup>. The mammographic images were analyzed according to the BIRADS system<sup>23</sup>. As for ethnicity, the self-designation of the participants in the cohort was considered at the subscription to the study, with categorization between whites and non-whites.

### **Molecular Analysis**

Genomic DNA was obtained from peripheral blood samples by the conventional extraction method<sup>24</sup>. The *GSTP1* Ile105Val polymorphism was studied by the TaqMan Real-time PCR assay method, after PCR, the fluorescence was measured on the ABI 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). The *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms were analyzed concurrently by the polymerase chain reaction (multiplex-PCR) as previously described<sup>25,26</sup>. The region of interest of the *GSTP1* gene (amplicon of 176bp) was amplified concurrently to the *GSTM1* and *GSTT1* analysis in the multiplex reaction and served as internal control of the reaction, through a previously described protocol with modifications<sup>27</sup>. The amplified products were resolved by electrophoresis on 2% agarose gel and viewed in ultraviolet light. The presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1* genes was

assessed by the detection of amplification products of 215bp and 480bp, respectively; this method does not distinguish homozygotes and heterozygotes.

### **Data 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)<sup>28</sup>.

### **Ethical Aspects**

The study was approved by the ethics committees of participating institutions and the inclusion of participants was done via the signature of the term of free and informed consent.

### **Results**

The average age at inclusion was 51 years (SD=7.6) and 421 women (56.1%) reported being in the postmenopausal period. For the sample as a whole, the average lifetime risk of developing breast cancer, estimated by the Gail model, was 7.8% (SD=3.3). Overall, 36.4% and 41.1% of the women had body mass index (BMI)

levels between 25 and 29.99 and  $\geq 30$ . A detailed description of the sample is presented in Table 1. All women were subjected to mammography and, as expected for participants of a mammographic screening program, the majority (97.5%) had benign image results (BIRADS 1 or BIRADS 2). As for the mammographic density, 413 (55.1%) women showed breast parenchyma with partial fat replacement in approximately 25-50% of the glandular area and 269 (35.9%) had dense, heterogeneous breast tissue in more than 51.0% of the mammary gland.

The frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes were 0.45 and 0.21, respectively, and 10.13% of the women had combined *GSTM1* and *GSTT1* genotypes. The genotypic frequencies of the *GSTP1* polymorphism were: 0.44 for the Ile/Ile genotype, 0.44 for the Ile/Val genotype, and 0.12 for the Val/Val genotype. The frequency of the Ile allele in this sample was 0.659. Categorizing the group under study in white and non-white women the *GSTP1* homozygous genotype (V/V) was more frequent in non-white than in white individuals, the former had a lower frequency of the heterozygous genotype. The *GSTP1* genotype frequencies in the sample in study are not in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p=0.005$ ). Other frequencies, in the sample in are described in Table 2.

There was no association between each *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genotypes and age at menarche, age at menopause or body mass index (data not shown). There was a positive association between the combined T–M– genotypes and mammographic images with BIRADS classifications 3 and 4 ( $p=0.013$ ) in pre-menopausal women and with moderately dense and dense breasts ( $p=0.040$ ) in post-menopausal women. In the individual analysis, the *GSTT1* null genotype was also strongly associated with increased mammographic density in post menopausal women ( $p=0.006$ ). As for ethnicity, considering the classification based on self-

designation, there was no difference in the association between T-M- and mammographic results or breast density between white and non-white women.

There was no statistically significant, positive or negative, association between *GSTP1* alleles and genotypes with mammography results and mammographic density.

## **DISCUSSION**

Reproductive risk factors for BC were not frequent in the sample studied. The age at menarche was relatively high, while the age at birth of the first child and at menopause was low. A small portion of women were nulliparous and the use of hormonal replacement therapy for more than 5 years was reported by only 3.5%. However, there were frequent reports of first-degree family history of BC, and a very significant proportion of women were overweight and/or obese. A study of 3665 women not affected by BC, from the same mammographic screening cohort and including the patients in this study, Reyes *et al.* (2009)<sup>29</sup> found high prevalence of overweight and obesity (69% with BMI  $\geq$  25) and low frequency of factors risk for breast cancer traditionally included in the Gail model, corroborating the findings of this study. As expected for a population sample, both in the study of Reyes *et al.* (2009)<sup>29</sup> and this study, estimates of risk for breast cancer by the Gail model were not higher than expected for the general population. However, Reyes *et al.* (2009)<sup>29</sup> observed that there was a statistically significant difference between categories of mammographic density and estimation of risk by the Gail model: the higher the mammographic density, the higher the estimate of risk. Considering that BMI and mammographic density are risk factors for BC, they suggested, as others, that the inclusion of these variables could improve models for estimation of risk in certain

populations<sup>30,31,32</sup>. Gail *et al.* (2009 and 2008)<sup>33,34</sup> also attempted to include data about seven single-nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with risk of BC to the calculation, but found only small differences from the estimate obtained with the traditional model, possibly due to choice of SNPs used in the study. The polymorphisms studied by Gail in 7 genes or regions of risk did not include the genes studied here, but the initiative shows that the inclusion of genotyping in risk models may be able to add information and improve the results of such models.

The genotypic frequencies found for *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes in our study were not different from those described in other studies in southern Brazil<sup>27,35</sup>. The *GSTM1* null genotype frequency is also similar to that described for other Brazilian samples<sup>36,37,38</sup>, and other populations<sup>10,39,40</sup>. However, the frequency of the *GSTT1* null gene in this sample was much smaller than previously found in other Western countries<sup>3,41</sup>.

Similarly, the *GSTP1* polymorphism genotype frequencies were similar to those found in other Brazilian studies<sup>35,38</sup>, and in studies in other populations predominantly European ancestry<sup>42,43</sup>, but are considerably different from those described in studies of China and Australia<sup>41,44</sup>.

Several evidences indicate an association between *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes and greater susceptibility to a number of tumors (colon, breast, bladder, head, and neck). Specifically in relation to risk for breast cancer, the results are somewhat controversial. In Brazil, Amorim *et al.* (2002)<sup>45</sup>, and in some studies of white and African-American women in other countries<sup>46,47,48</sup>, there are reports that show no association between the deletion in *GSTT1* and *GSTM1* genes and risk for breast cancer. However, other recent studies found increased risk of breast cancer in women with combined *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes<sup>3,49</sup>. There are also prior

reports of association between null genotypes of these genes and mammographic density, a recognized risk factor for breast cancer. In a national study, Morais *et al.* (2008)<sup>36</sup> found that women with deletion of the *GSTM1* gene had dense breast patterns more often. Chambo *et al.* (2009)<sup>50</sup> found no relationship between the *GSTM1* gene and mammographic density.

In summary, we identified an association between *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes and mammographic images classified as BIRADS 3 and 4 in pre-menopausal women ( $p=0.013$ ) and between the same combined genotypes and mammographic density (dense and moderately dense breasts) in post-menopausal women ( $p=0.040$ ). The *GSTT1* null genotype alone, was also strongly associated with increased mammographic density in post-menopausal women ( $p = 0,006$ ). These findings reinforce results from previous studies from our group and other authors, indicating that the inclusion of genotypic analyses and prevalent breast cancer risk factors in risk models, can improve the estimation of breast cancer risk in specific populations.

**Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The Núcleo Mama (NMAMA) Cohort, from which the patients derive, is supported by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency of Porto Alegre. The authors acknowledge Giovana Skonieski, Karen Barboza de Pereira, Ademar Bedin Júnior, Dakir Duarte Filho 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, proceedings 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).

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

<b>Variable</b>	<b>n (%)</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>
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	31 (4.13)	---	---
Postmenopausal (%)	421 (56.1)	---	---
Age at menopause (years)	---	47.0	5.5
Use of hormone replacement	118 (28.1)	---	---
Use of hormone replacement for $\geq 5$ ys	26 (3.5)	---	---
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	---	29.6	5.8
$\leq 18.4$	6 (0.8)	---	---
18.5-24.99	158 (21.1)	---	---
25-29.99	273 (36.4)	---	---
$\geq 30$	308 (41.1)	---	---
Previous breast biopsy	40 (5.3)	---	---

**Table 2. Frequency of *GSTM1/GSTT1* null genes and *GSTP1* (Ile105Val) in the sample studied.**

Nome	Genotype frequency n (%)			Allele frequency		P
	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ile/Val</i>	<i>Val /Val</i>	<i>Ile</i>	<i>Val</i>	
<b><i>GSTP1</i></b>						
Overall	330 (44.0)	329 (43.9)	91 (12.13)	0.659	0.341	.....
Whites	268 (44.7)	270 (45.1)	61 (10.2)	0.67	0.33	.....
Non-whites	62 (41.0)	59 (39.1)	30 (19.9)	0.61	0.39	.....
						0.005
<b><i>GSTM1</i></b>	<b><i>M1 -</i></b>	<b><i>M1+</i></b>				
Overall	339 (45.2)	411 (54.8)				.....
Whites	281 (46.9)	318 (53.1)				.....
Non-whites	58 (38.4)	93 (61.6)				.....
						0.061
<b><i>GSTT1</i></b>	<b><i>T1 -</i></b>	<b><i>T1+</i></b>				
Overall	158 (21.0)	592 (78.9)				.....
Whites	119 (19.9)	480 (80.1)				.....
Non-whites	39 (25.8)	112 (74.2)				.....
						0.108
<b><i>GSTT1 /M1</i></b>	<b><i>T1 -/M1 -</i></b>	<b><i>T1+/M+</i></b>				
Total	76 (10.1)	674 (89.9)				.....
Whites	64 (10.7)	535 (89.3)				.....
Non-whites	12 (7.9)	139 (92.1)				.....
						0.319

Number of subjects studied: Overall = 750; whites = 599; non-white = 151.

\*P-value = whites X non-whites

## REFERENCES

1. World Health Organization webpage. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>. Accessed: June, 2009.
2. Disponível de URL: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) (acessado em 10/06/2009).
3. Park SK, Kang D, Noh DY, Lee KM, Kim SU, Choi JY, *et al.* Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78:89-96.
4. Raunio Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility – a review. *Gene* 1995; 159:113-121.
5. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, Teare MD, Ponder BAJ, Easton DF, *et al.* A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomar Prev* 1999;8:843-54.
6. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarkers response, and cancer. *Mutat. Res* 2003; 544, 339–348.
7. Miller PD, Liu G, De Vivo I, Lynch TJ, Wain JC, Su L, *et al.* Combination of the variant genotype of *GSTP1*, *GSTM1* and, *p53* are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res* 2002; 62:2819-2823.
8. Hirvonen A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 1995; 37: 37-41.
9. Cavenee WK e White RL. The genetic basis of cancer. *Sci. Am* 1995 272: 72-79.
10. Zheng W, Wen WQ, Gustafson DR, Gross M, Cerhan JR, Folsom AR. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74:9-16.
11. Hayes JD, Pulford DJ. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30(6): 445-600.
12. Lancaster JM, Berhuck A, Carney ME, Wiseman R, Taylor JA. Progesterone receptor gene polymorphism and risk for breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 1998; 78:227.
13. Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genetics and Molecular Biology* 1999; v.22 (Suppl).

14. Seidgard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione S-transferase activity on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 7293-7297.
15. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In: *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer* (Vineis, P., Malats, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J. and Boffetta, P. *IARC Scientific Publications* 1999; Lyon, IARC, N° 148, pp. 231-249.
16. Watson MA, Stewart RK, Smith GBJ, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphism: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19: 275-280.
17. Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermini LS. A novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans, *Biochem. J* 1997; 328: 929± 935.
18. Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Peter WJ, Strange RC, Spiteri MA. Polymorphism at the Glutathione S-transferase GSTP1 Locus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161: 1437–1442.
19. Cavalieri EL, Stack DE, Debanesan PD, Todorovic R, Dwivedy L, Higginbotham S, *et al.* Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 10937-10942.
20. Lear J, Heagerty A, Bowers B, Jones P, Gilford J, Aldersea J, *et al.* Polymorphism in detoxifying enzymes and susceptibility to skin cancer. *Photochem. Photobiol* 1996; 63: 424-428.
21. Caleffi M, Ashton-Prolla P, Weber B, Zignani JM, Dias EC, Antunes LP. *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.
22. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Sylvan BC, Schairer GC, Mulvihill JJ. 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.
23. American College of Radiology. Illustrated breast imaging reporting and data system (BIRADS). Reston: *American College of Radiology*, 3<sup>th</sup> edition, 1998.
24. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.

25. Amorim LMF, Rossini A, Mendonça GAS, Lotsch PF, Simão TA, Gallo CVM, *et al.* CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett* 2002; 181: 179-186.
26. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996; 107: 229–233.
27. Gaspar PA, Moreira J, Kvitko K, Torres MR, Moreira A and Weimer TA. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSP1, and TP53 polymorphisms: Do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and nonsmall- cell lung cancer. *Genet Mol Biol* 2004; 27:133-138.
28. Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): Computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives and Innovations* 2004; 1(6):1-10.
29. Reyes VB. Estimativa de risco de câncer de mama, segundo o modelo de GAIL, em uma população submetida a rastreamento mamográfico em Porto Alegre [dissertação de mestrado]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
30. Chen J, Pee D, Ayyagari R, Graubard B, Schairer C, Byrne C, *et al.* Projecting absolute invasive breast cancer risk in White women with a model that includes mammographic density. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:1215-1226.
31. Barlow WE, White E, Ballard-Barbash R, Vacek PM, Titus-Ernstoff L, Carney PA, *et al.* Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1204-1214.
32. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Statist. Med* 2004; 23:1111-1130.
33. Gail MH. Value of Adding Single-Nucleotide Polymorphism Genotypes to a Breast Cancer Risk Model. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: (13) 959 – 963.
34. Gail MH. Discriminatory accuracy from single-nucleotide polymorphisms in models to predict breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100 (14): 1037 – 1041.
35. Kvitko K, Gaspar PA, Torres MR, Hutz MH. CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSP1 polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology* 2006; 29, 4, 613-616.
36. Morais LMTS, Filho CC, Lourenço GJ, Shinzato JY, Zeferino LC, Lima CSP, *et al.* Características Mamográficas Do Câncer De Mama Associadas aos Polimorfismos GSTM1 E GSTT1, *Revista Assoc Méd Bras* 2008; 54 (1): 61-6.

37. Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, *et al.* Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res* 2004; 37: 451-458.
38. Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, Macedo JMB, Medina R, Neto JFN, *et al.* Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. and Mol. Res* 2002;1 (3): 233-240.
39. Van Der Hel OL, Bueno-De-Mesquita HB, Van Gils CH, Roest M, Slothouber B, *et al.* Cumulative genetic defects in carcinogen metabolism may increase breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 675–681.
40. Milikan R, Pittman G, Tse C, Savitz DA, Newman B, Bell D. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 567-73.
41. Egan KM, Kai Q, Shu XO, Jin F, Zhu TL, Dai Q, *et al.* Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the risk for breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(2):197-204.
42. Samson M, Swaminathan R, Rama R, Sridevi V, Nancy KN, *et al.* Role of GSTM1 (Null/Present), GSTP1 Ile105Val) and P53 (Arg72Pro) genetic polymorphisms and the risk of breast cancer: a case control study from South India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007; 8(2):253–257.
43. Gudmundsdottir K, Tryggvadottir L, and Eyfjord JE. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Genotypes in Relation to Breast Cancer Risk and Frequency of Mutations in the p53 Gene. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001; Vol. 10, 1169–1173.
44. Curran, JE, Weinstein SR and Griffiths LR. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility. *Cancer Lett* 2000; 153: 113–120.
45. Amorim LMF, Rossini A, Mendonça GAS, Lotsch PF, Simão TA, Gallo CVM, *et al.* CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett* 2002; 181: 179-186.
46. Ambrosone CB, Coles BF, Freudenheim JL, Shields PG. Glutathione S-transferase (GSTM1) genetic polymorphisms do not affect human breast cancer risk, regardless of dietary antioxidants, *J. Nutr* 1999; 129: 565S–568S.
47. Bailey LR, Roodi N, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Breast cancer risk and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer Res* 1998; 58: 65–70.
48. Maugard CM, Charrier J, Bignon Y-J. Allelic deletion at glutathione S-transferase M1 locus and its association with breast cancer susceptibility. *Chem. Biol. Interact* 1998;111: 365–375.

49. Mitrinen K, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Kang D, Benhamou S, *et al.* Combined COMT and GST genotypes and hormone replacement therapy associate breast cancer risk. *Pharmacogenetics* 2002; 12 (1):67-72.
50. Chambo D, Kemp C, Costa AMM, Souza NCN, Guerreiro da Silva IDC. Polymorphism in CYP17, GSTM1 and the progesterone receptor genes and its relationship with mammographic density. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42: 323-329.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações finais são apresentadas de acordo com os objetivos propostos inicialmente.

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 *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1 A/G*, correlacionando os achados moleculares com fatores de risco para CM nesta amostra.

É importante ressaltar que o presente estudo é uma ramificação de um projeto maior de acompanhamento mamográfico de mulheres cadastradas em 19 unidades de atenção básica à saúde, pertencentes ao Programa Saúde da Família na zona Sul de Porto Alegre.

Considerando que o câncer de mama é a primeira causa de óbitos por câncer no estado do Rio Grande do Sul e que Porto Alegre apresenta taxas de incidência ainda mais elevadas, especialmente na faixa etária de 50 a 69 anos, a primeira etapa do estudo foi caracterizar a amostra quanto à prevalência de fatores de risco para câncer de mama já estabelecidos na literatura.

A amostra estudada não apresentou fatores de risco reprodutivos significativos para a doença. A idade média encontrada na menarca foi relativamente tardia (13 anos, DP: 1.8), a idade média na menopausa, foi precoce (47 anos, DP: 5.5), identificou-se um pequeno percentual de mulheres nulíparas (4%) e uma idade média ao nascimento do primeiro filho também precoce (22 anos, DP: 5.3). 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%) apresentou achados mamográficos benignos (*BIRADS* 1 ou 2). 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 apresentavam mamas moderadamente densas, 413 (55.1%) apresentavam 25-50% de tecido fibroglandular e 269 (35.9) apresentavam mamas com padrão denso e heterogêneo. A maioria das mulheres incluídas no estudo (n= 623, 83.1%) relatou uso atual ou passado de ACO, e 118 (15.7%) relataram uso atual ou passado de TRH, mas em apenas 26 mulheres (3.5%) este uso foi constante por cinco ou mais anos.

Um achado surpreendente foi que 36.4% e 41.1% das mulheres apresentavam IMC entre 25 e 29.99 e  $\geq 30$ , respectivamente. Portanto, 77.5% das mulheres incluídas no estudo apresentavam IMC correspondente a sobrepeso ou obesidade, um dado preocupante e que precisa ser investigado em maior detalhe nas demais mulheres da região que se encontram nesta faixa etária, já que várias evidências apontam para uma clara relação de risco entre IMC elevado e câncer de mama.

Em relação às frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados, observou-se que não diferem de outros estudos nacionais prévios realizados com indivíduos da população geral do Sul e Sudeste. Para os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* as frequências do genótipo homocigoto nulo (-/-) foram: 0.45 e 0.21, respectivamente, e 10.13% das mulheres apresentaram genótipo nulo para ambos genes. As frequências do genótipo homocigoto nulo (-/-) do polimorfismo *GSTM1* encontradas em mulheres auto-denominadas brancas e nas não-brancas foram: 0.46 e 0.38 respectivamente. Para o polimorfismo nulo *GSTT1* as frequências do genótipo homocigoto nulo (-/-) encontradas em mulheres brancas e não-brancas foram: 0.19 e 0.25 respectivamente. Para o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val as frequências genótípicas encontradas no total da amostra, em mulheres brancas e não-brancas foram: (a) para genótipo Ile/Ile, 0.44, 0.44 e 0.41

respectivamente; (b) para genótipo Ile/Val, 0.43, 0.45 e 0.39 respectivamente, e (c) para genótipo Val/Val, 0.12, 0.10 e 0.19 respectivamente. A frequência do alelo Ile nos três grupos foi 0.66, 0.67 e 0.61. A distribuição genotípica do polimorfismo *GSTP1* Ile/Val na amostra total e em mulheres brancas estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas não na amostra de mulheres não brancas. As frequências genotípicas encontradas no presente estudo diferem significativamente de outras descritas previamente em populações americanas, européias e asiáticas.

Por fim, foram realizadas análises de associação entre os diferentes genótipos dos três polimorfismos estudados e fatores de risco estabelecidos para CM. Os resultados obtidos demonstraram que houve uma associação significativa entre: os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos (associados a maior risco) e imagens mamográficas com classificação BIRADS 3 e 4 em mulheres pré-menopáusicas e com mamas moderadamente densas e densas em mulheres pós-menopáusicas; o genótipo *GSTT1* nulo isolado foi associado a maior densidade mamográfica em mulheres pós menopáusicas. Não houve associação positiva ou negativa, estatisticamente significativa, entre os alelos e genótipos de *GSTP1* com resultado da mamografia e densidade mamográfica. Houve diferença estatisticamente significativa entre mulheres brancas e não-brancas e genótipos de *GSTP1* considerando a classificação utilizada a partir de auto-denominação.

Os achados deste estudo reforçam resultados de estudos anteriores de nosso grupo e de outros autores, que demonstraram associações entre polimorfismos de baixa penetrância e fatores de risco estabelecidos para câncer de mama. Estas associações, embora incipientes e merecedoras de estudos adicionais em amostras maiores e em estudos com delineamento caso-controle, sugerem que a inclusão de análises genotípicas e de fatores de risco especialmente prevalentes em

determinadas populações poderiam aprimorar a estimativa de risco de câncer de mama.

## 7. ANEXOS

## 7.1. Freqüências genótípicas e fenótípicas dos polimorfismos estudados

### 7.1.1 Polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1*

Tabela 5. Polimorfismos *GSTT1*(-), *GSTM1*(-) em mulheres sem câncer de mama

Referências	País	Estado	n	Tipo de Amostra	<u>Frequências genótípicas</u>			
					<i>GSTT1</i> (-) n (%)	p	<i>GSTM1</i> (-) n (%)	p
Presente Estudo	Brasil	RS	750	Populacional	158(21.0)		339(45.2)	
Rossini <i>et al.</i> 2002	Brasil	RJ	591	Doadores de sangue	150(25.4)	0.062	249(42.1)	0.261
Kvitko <i>et al.</i> 2006	Brasil	RS	190	Hospitalar	49(25.7)	0.161	84(44.2)	0.807
Gaspar <i>et al.</i> 2004	Brasil	RS	90	Populacional	19(21.1)	0.992	45(50.0)	0.388
Gattás <i>et al.</i> 2004	Brasil	SP	594	Doadores de sangue	137(23.1)	0.380	261(43.9)	0.644
Gattás <i>et al.</i> 2000	Brasil	SP	292	Populacional			160(54.8)	0.005
Amorim <i>et al.</i> 2002	Brasil	RJ	256	Hospitalar	65(25.4)	0.150	103(40.2)	0.167
Morais <i>et al.</i> 2008	Brasil	SP	169	Doadores de sangue	33(19.5)	0.656	75(44.4)	0.846
Linhares <i>et al.</i> 2005	Brasil	SP	278	Hospitalar			104(37.4)	0.025
Torresan <i>et al.</i> 2008	Brasil	PR	102	Hospitalar	33(30.0)	0.010	56(55.0)	0.065
Millikan <i>et al.</i> 2000	EUA		663	Populacional	104(15.7)	0.009	264(39.8)	0.041
Bailey <i>et al.</i> 1997	EUA		221	Hospitalar	61(27.6)	0.041	124(56.0)	0.004
Zheng <i>et al.</i> 2002	EUA		481	Populacional	62(12.9)	<0.001	249(51.8)	0.024
Curran <i>et al.</i> 2000	Austrália		129	Banco de material humano	20(16.0)	0.146	72(56.0)	0.026
Van der Hel <i>et al.</i> 2004	Holanda		263	Banco de material humano	50(19.0)	0.478	129(49.0)	0.281
Egan <i>et al.</i> 2003	China		1221	Populacional	596(49.3)	<0.001	683(56.6)	<0.001
Park <i>et al.</i> 2004	Korea		289	Hospitalar	121(41.9)	<0.001	152(52.6)	0.032

(-) nulo

p < 0.05 = statistically significant

**Tabela 6. Polimorfismos GSTT1(-), GSTM1(-) em mulheres com câncer de mama**

Referências	País	Estado	n	Frequências genotípicas					
				GSTT1(-) n (%)	p	GSTM1(-) n (%)	p	GSTT1/GSTM1(-) n (%)	p
Presente Estudo	Brasil	RS	45	4(8.8)		19(42.2)		2(4.4)	
Amorim <i>et al.</i> 2002	Brasil	RJ	128	32 (25)	0.025	50(39.1)	0.829	9(7)	0.561
Millikan <i>et al.</i> 2000	USA		688	110(16)	0.221	260(37.8)	0.679		
Morais LMTS <i>et al.</i> 2008	Brasil	SP	91	20(15)	0.066	40(35)	0.737	6(5.5)	0.637
Egan <i>et al.</i> 2003	China		1144	557(49)	<0.001	638(56.2)	0.052		
Bailey <i>et al.</i> 1997	EUA		223	59(26.5)	0.013	111(49.7)	0.282		
Curran <i>et al.</i> 2000	Austrália		129	27(21)	0.077	73(57)	0.072		
Syamala <i>et al.</i> 2007	India		347	56(16)	0.222	119(34.3)	0.386		
Samson <i>et al.</i> 2007	India		250			65(26)	0.043		
Yang <i>et al.</i> 2004	China		1034	485(46.9)	<0.001	577(55.8)	0.052		
Zheng <i>et al.</i> 2002	USA		202	39(25.7)	0.106	100(49.5)	0.301		
Linhares <i>et al.</i> 2005	Brasil	SP	105			32(30,4)	0.219		
Park <i>et al.</i> 2004	Korea		190	101(50.5)	<0.001	116(58)	0.015		
Brockstedt <i>et al.</i> 2002	Canadá		35	6(18)	0.285	16(47)	0.668		
Lizard-Nacol <i>et al.</i> 1999	França		92			53(57.6)	0.068		
Gudmundsdottir <i>et al.</i> 2001	Islandia		500	99(19.8)	0.082	273(54.6)	0.081		
Van der Hel <i>et al.</i> 2004	Holanda		229	36(16)	0.255	133(58)	0.036		
R. Medeiros <i>et al.</i> 2004	Portugal		41	6(14.6)	0.428	21(51.2)	0.340		

(-) nulo

p < 0.05 = statistically significant

## 7.1.2 Polimorfismo *GSTP1* A/G

Tabela 7. Polimorfismo *GSTP1* (Ile105Val) em mulheres sem câncer de mama

Referências	País	Estado	n	Tipo de Amostra	Frequências genotípicas			Frequências Alélicas		p
					II - n (%)	IV - n (%)	VV - n (%)	I (%)	V (%)	
Presente Estudo	Brasil	RS	750	Populacional	330(44.0)	329(43.9)	91(12.1)	0.66	0.34	
Rossini <i>et al.</i> 2002	Brasil	RJ	591	Doadores de sangue	294(49.7)	225(38.1)	72(12.2)	0.69	0.31	0.081
Kvitiko <i>et al.</i> 2006	Brasil	RS	190	Hospitalar	76(40.0)	94(49.5)	20(10.5)	0.65	0.35	0.377
Torresan <i>et al.</i> 2008	Brasil	PR	102	Hospitalar	61(59.0)	38(37.0)	3(4.0)	0.78	0.22	0.002
Millikan <i>et al.</i> 2000	EUA		663	Populacional	195(32.7)	304(51.0)	96(16.0)	0.58	0.42	<0.001
Curran <i>et al.</i> 2000	Austrália		129	Banco de material humano	59(45.7)	64(49.7)	6(4.6)	0.70	0.30	0.039
Gudmundsdottir <i>et al.</i> 2001	Islandia		395	Banco de material humano	177(44.8)	172(43.6)	46(11.6)	0.67	0.33	0.953
Syamala <i>et al.</i> 2007	India		250	Populacional	125(50.0)	109(43.6)	16(6.4)	0.72	0.28	0.027
Samson <i>et al.</i> 2007	India		500	Populacional	230(46.0)	219(43.8)	51(10.2)	0.68	0.32	0.534
Egan <i>et al.</i> 2003	China		1221	Populacional	809(66.8)	371(30.6)	31(2.6)	0.82	0.18	<0.001

p < 0.05 = statistically significant

**Tabela 8. Polimorfismo GSTP1 (Ile105Val) em mulheres com câncer de mama**

Referências	País de origem	Estado	n estudo	Frequências genotípicas			Frequências Alélicas		p
				II - n (%)	IV - n (%)	VV - n (%)	I (%)	V (%)	
Presente Estudo	Brasil	RS	45	18(40)	23(51.1)	4(8.9)	0.65	0.35	
Millikan <i>et al.</i> 2000	EUA		616	239(38.7)	286(46.4)	91(14.8)	0.62	0.38	0.543
Egan <i>et al.</i> 2003	China		1139	723(63)	363(32)	53(5)	0.79	0.21	0.006
Curran <i>et al.</i> 2000	Austrália		129	63(49)	55(43)	11(8)	0.70	0.30	0.577
Syamala <i>et al.</i> 2007	India		125	72(57.6)	42(33.6)	11(8.8)	0.74	0.26	0.101
Samson <i>et al.</i> 2007	India		250	116(46.6)	105(41.9)	29(11.5)	0.67	0.33	0.516
Yang <i>et al.</i> 2004	China		1034	651(63)	333(32.2)	50(4.8)	0.79	0.21	0.008
Sweeney <i>et al.</i> 2000	EUA		240	110(46)	107(45)	23(9)	0.68	0.32	0.719
Gudmundsdottir <i>et al.</i> 2001	Isalândia		500	202(40.4)	225(45)	73(14.6)	0.63	0.37	0.524

p < 0.05 = statistically significant

## 7.2. Cálculos de equilíbrio de Hardy-Weinberg

**Tabela 9. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra total de mulheres do estudo (n= 750)**

Polimorfismo Genótipos	n observado (%)	n esperado	
<b>GSTP1A/G</b>			
AA	330	$p^*p^*n = 326$	$p=0.659$
AG	329	$2*p^*q*n = 337$	$q=0.341$
GG	91	$q^*q^*N = 87$	H-W=0,515

**Tabela 10. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres brancas do estudo (n= 599)**

Polimorfismo Genótipos	n observado (%)	n esperado	
<b>GSTP1A/G</b>			
AA	268	$p^*p^*n = 271$	$p=0.67$
AG	270	$2*p^*q*n = 264$	$q=0.33$
GG	61	$q^*q^*N = 64$	H-W=0,57

**Tabela 11. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de mulheres não-brancas do estudo (n= 151)**

Polimorfismo Genótipos	n observado (%)	n esperado	
<b>GSTP1A/G</b>			
AA	62	$p^*p^*n = 55$	$p=0.605$
AG	59	$2*p^*q*n = 72$	$q=0.395$
GG	30	$q^*q^*N = 24$	H-W=0.03 <sup>#</sup>

(#)  $p < 0.05$ .

### 7.3. Protocolo de extração de DNA

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

<b>Solução de Lise de Hemácias (RBC)</b>	5 mM Cloreto de Magnésio (MgCl <sub>2</sub> ) 1 mM EDTA pH 8,0
<b>Solução de Lise Celular (CLS)</b>	10 mM Tampão Tris pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0 1% SDS
<b>Solução de Precipitação de Proteína</b>	7,5 M Acetato de amônio (NH <sub>4</sub> Ac)
<b>Outros Agentes Utilizados</b>	Isopropanol 100% Etanol 70% Tampão TE 1X
<b>RBC</b>	0,5 ml MgCl <sub>2</sub> 1 M 0,2 ml EDTA 0,5 M 100 ml água destilada
<b>CLS</b>	1 ml Tris 1 M 0,2 ml EDTA 0,5 M 10 ml SDS 10% 100 ml H <sub>2</sub> O 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 ressuspendidas 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  $\mu$ l de tampão TE 1X que resulta em uma concentração aproximada de 400  $\mu$ g/ $\mu$ 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;

#### 7.4. Protocolo de PCR-Multiplex dos Polimorfismos *GSTT1* e *GSMT1*

**Tabela 12. Componentes para a reação de PCR-Multiplex.**

Componente	Concentração Estoque	Concentração final	Volume por reação (µl)
Água	Qsp	qsp	9.25
Tampão	10X	1X	2.0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.6 mM	1.8
dNTP	2 mM	0.04 mM	1.2
Primer Forward <i>GSTT1</i>	20 pmol	0.4 pmol	0.1
Primer Reverse <i>GSTT1</i>	20 pmol	0.4 pmol	0.1
Primer Forward <i>GSTM1</i>	20 pmol	0.4 pmol	0.1
Primer Reverse <i>GSTM1</i>	20 pmol	0.4 pmol	0.1
Primer Forward <i>GSTP1</i>	20 pmol	0.4 pmol	0.1
Primer Reverse <i>GSTP1</i>	20 pmol	0.4 pmol	0.1
Taq pht	5 unidades/ µl	1 unidade	0.15
DNA	20 ng/µl	100 ng/µl	5.0
Total	---	---	20

#### Programa para o PCR no Termociclador Eppendorf Mastercycler:

a) 94°C            5 minutos

b) 94°C            1 minuto

c) 60°C a 59 °C 1 minuto

d) 72°C            1 minuto

do passo b até passo d – 2 ciclos reduzindo 1°C

e) 94°C            1 minuto

f) 59°C            1 minuto

g) 72 °C            5 minutos

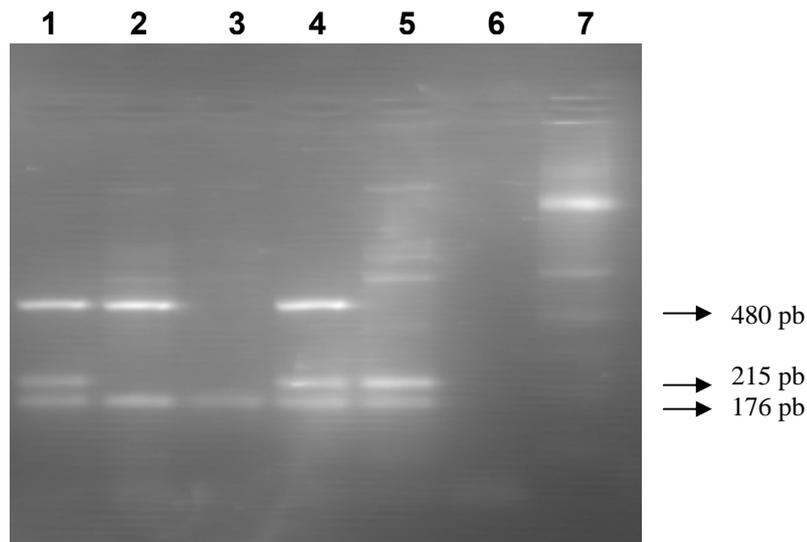
do passo e até passo g – 29 ciclos

#### Gel de agarose (2%):

2 g agarose

7 µl brometo de etídio (1µg/ml)

100 ml tampão TBE 1X



**Figura 3:** PCR Multiplex para a identificação dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em gel de agarose 2,0%. O fragmento de 176 pb representa o gene *GSTP1*, utilizado como controle da amostra de DNA. Fragmentos de 480 pb e 215 pb correspondem à presença dos alelos *GSTT1* e *GSTM1*, respectivamente. A reação controle negativo e o marcador do tamanho do DNA, (ladder 100pb) estão representados nas colunas 6 e 7. Indivíduo com deleção combinada do *GSTM1* e *GSTT1* - coluna 3; indivíduos com a presença de *GSTM1* e *GSTT1* – coluna 4; indivíduo com deleção de *GSTT1* - coluna 5; indivíduos com deleção de *GSTM1* – coluna 2. A coluna 1 representa o controle positivo da reação.

## 7.5. Protocolo de PCR Tempo Real do Polimorfismo *GSTP1A/G*

**Tabela 13. 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.

## 7.6. Seqüências das sondas utilizadas para análise do polimorfismo analisado por PCR Tempo Real

### 7.6.1. Polimorfismo *GSTP1 A/G*:

(dbSNP ID: rs 1695 e Assay ID: C\_\_\_3237198\_20):

[VIC/FAM]

CGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC[A/G]TCTCCCTCATCTACACCAACTATGT

## 7.7. Gráficos de discriminação alélica e amplificação do polimorfismo *GSTP1* A/G analisado por PCR Tempo Real

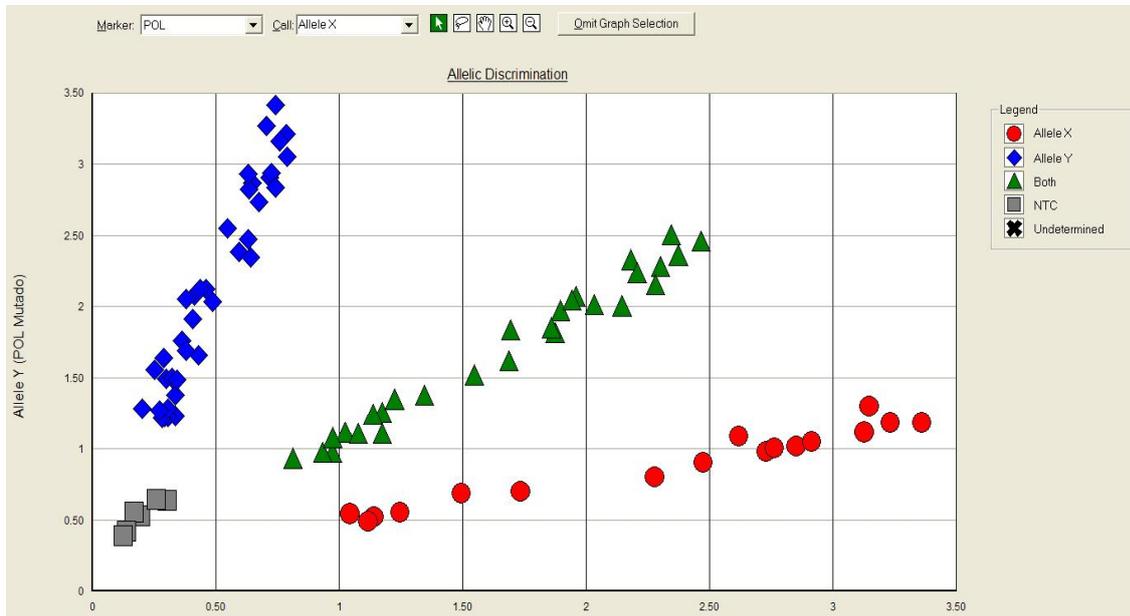


Gráfico 1. Discriminação alélica do polimorfismo *GSTP1* A/G. Observa-se em azul (diamante) amostras com o genótipo AA, em verde (triângulo) amostras com o genótipo AG, em vermelho (esfera) amostras com o genótipo GG. Em cinza (quadrado) estão denotados os “brancos”.

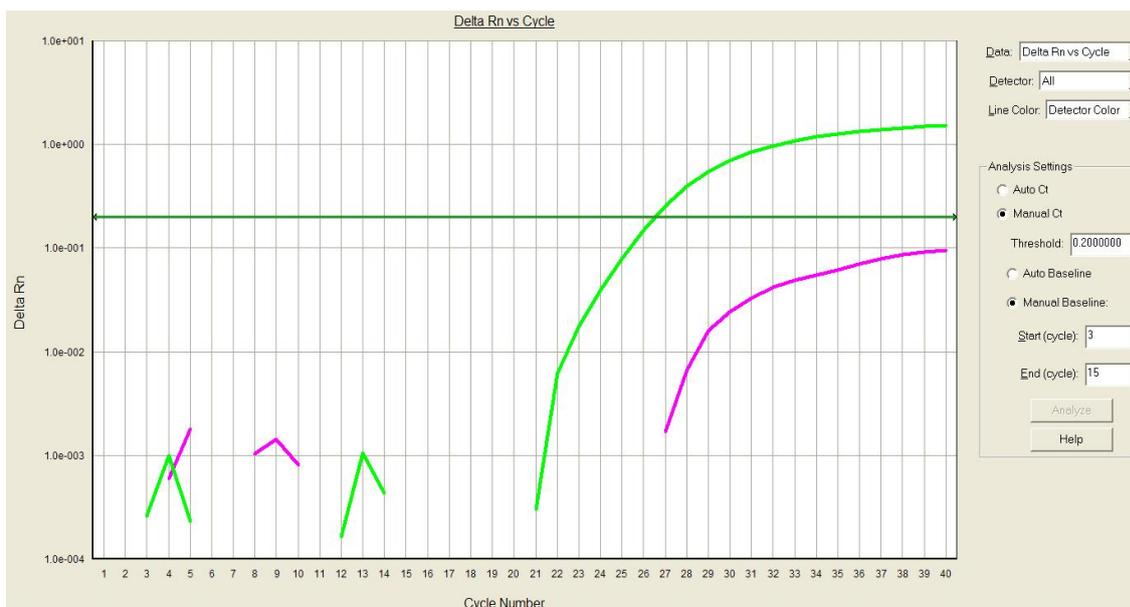
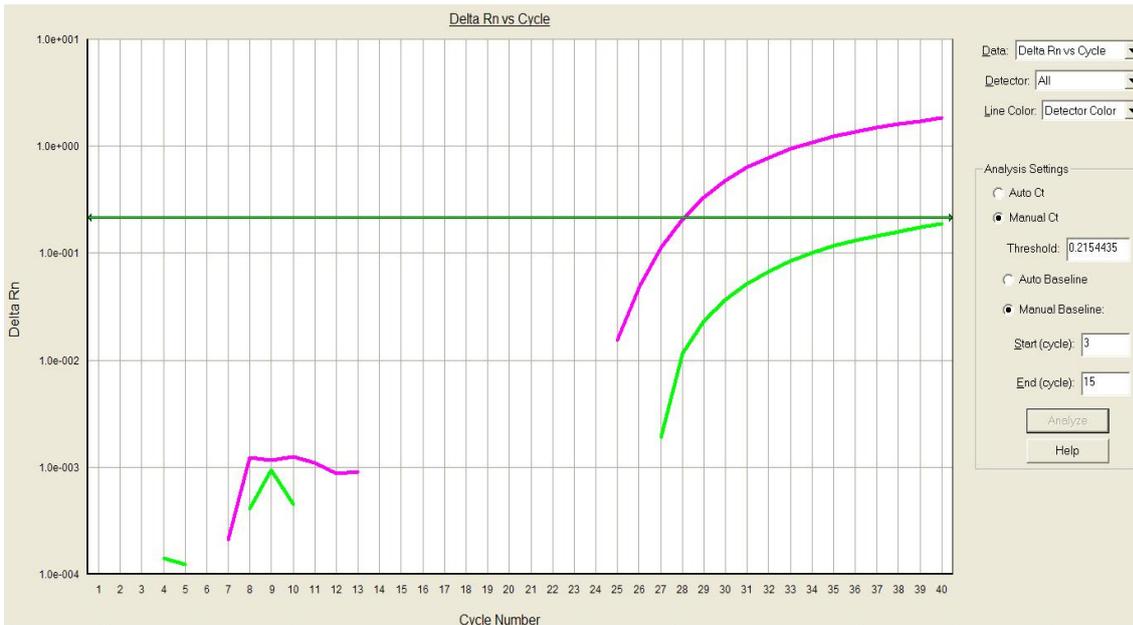
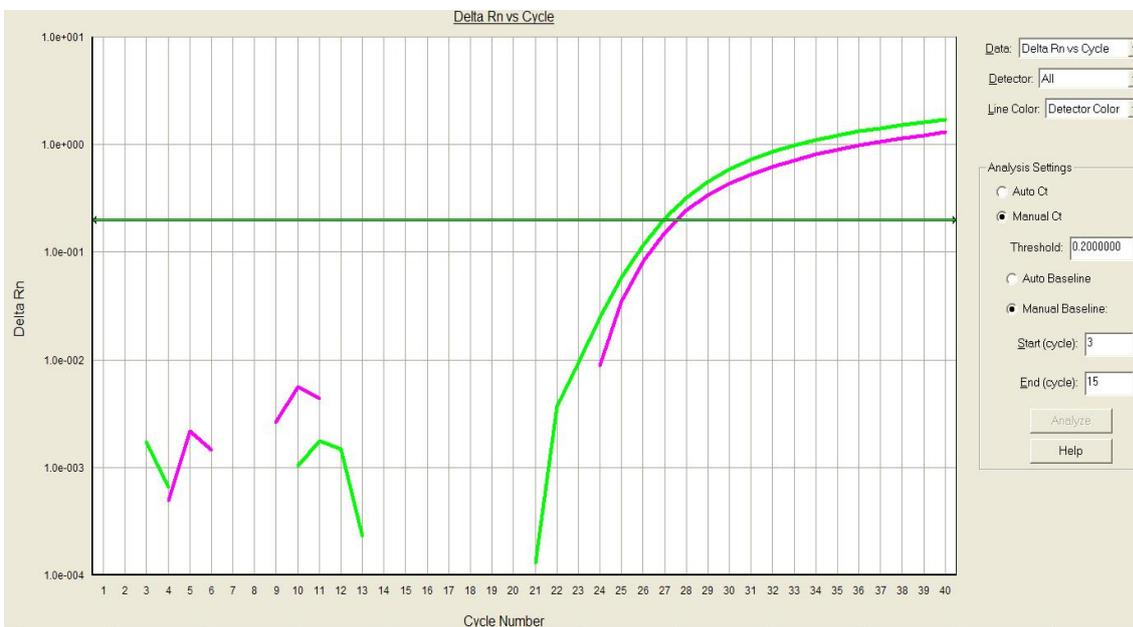


Gráfico 2. Amplificação de uma amostra (genótipo AA do polimorfismo *GSTP1* A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC.



**Gráfico 3. Amplificação de uma amostra (genótipo GG do polimorfismo GSTP1 A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com FAM.**



**Gráfico 4. Amplificação de uma amostra (genótipo AG do polimorfismo GSTP1 A/G) em que houve anelamento da sonda marcada com VIC e da sonda marcada com FAM.**

## 7.8. 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:**

LAVINIA SCHULER-FACCINI

PATRICIA ASHTON PROLLA

EDENIR INEZ PALMERO

ROBERTO GIUGLIANI

LUCIANE KALAKUN

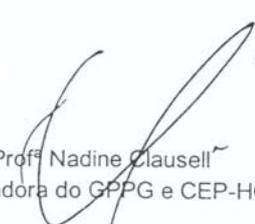
MAIRA CALEFFI

**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.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

## 7.9. 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		
<b>Objetivos do Projeto</b> 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 genotípicas das variações obtidas no estudo com as já descritas na literatura.		
<b>Sumário do Projeto</b> O câncer de mama é um problema significativo de saúde pública, devido á 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.		

<i>Aspectos relevantes para avaliação</i>	<i>Situação</i>
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
Delineamento	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
Critérios 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

## 7.10. 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  
05/01/06  
WR 05182

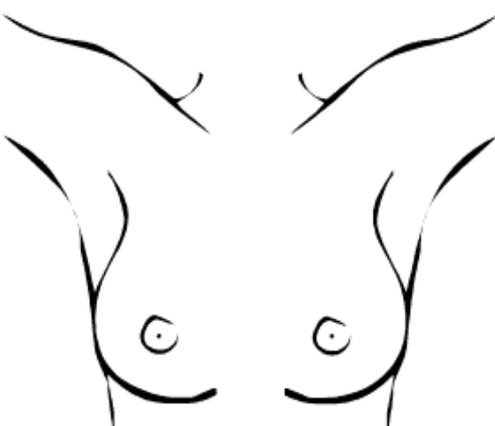
## 7.11. Ficha de Levantamento de Dados do Núcleo Mama Porto Alegre

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		sim	não
9. Peso (kg):		12. Tem hábito de fumar?			
10. Altura (m):		13. Quantos cigarros/dia:			
11. IMC (peso/altura <sup>2</sup> ):					
RISCO TIPO IV - USO DE BEBIDA ALCOÓLICA		sim	não	1 medida = vinho: 2 copos cerveja: 1 garrafa ou 2 latas destilados: 2 doses	
14. Tem hábito de ingerir bebida alcoólica?					
15. Quantas medidas por dia?					
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:			

## 7.12. 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"/> <b>Câncer mamário</b> Cirurgia: _____ T__N__M__ E: _____ Data: __/__/_____ Anatomopatológico: _____	
Exames Apresentados	
<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
História Gineco Obstétrica	
<b>Menstruação</b> Menarca: ____ anos	
<b>Gestações</b> 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			
<b>Menopausa</b>			
Idade: _____ <input type="checkbox"/> Natural <input type="checkbox"/> Cirúrgica			
<b>Reposição Hormonal</b>			
<input type="checkbox"/> Em uso    N° 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			
<b>Contraceção/ Método</b>			
<b>Outras doenças</b>			
<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			
<b>Sexualmente Transmissíveis</b>			
<input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> HPV (Verrugas) <input type="checkbox"/> Outros _____			
<b>Revisão de sistemas</b>			
Doenças:			
Cirurgia Prévias :			
Alergias:			
<b>História Familiar</b>			
Alguns de seus parentes de 1° grau tem ou teve câncer ? (pai , mãe , irmã , filho ou filha) Se a resposta for sim Indique : Familiar _____ Tipo: _____ Idade de início: _____  Alguns de seus parentes de 1° 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 Alguns homens 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"			
<b>Perfil Psicossocial</b>			
<b>Situação</b>	<b>Início</b>	<b>Término</b>	<b>Observações</b>

<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				
<b>Situação familiar</b>				
<b>Exame da Mama</b>				
	<b>LEGENDA</b>	<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>	<b>Tipo</b> 	<b>Lesão</b> <i>Nódulo</i> <i>Nodularidade</i> <i>Retração</i> <i>Pele alterada</i>
		<b>Região</b>	<b>Tipo</b>	<b>Dimensões</b>
<b>CONDUTA PROPOSTA:</b>				
<b>ENCAMINHAMENTO:</b>				
<b>EVOLUÇÃO:</b>				
<b>DATA:</b>				
<b>DATA:</b>				

## 7.13. Produção científica relacionada. Palmero et al. 2008.

Author's personal copy



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Cancer Letters 261 (2008) 21–25



[www.elsevier.com/locate/canlet](http://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 <sup>a,b</sup>, Lavínia Schüler-Faccini <sup>a,c,d</sup>, Maira Caleffi <sup>e</sup>,  
Maria Isabel Waddington Achatz <sup>f</sup>, Magali Olivier <sup>g</sup>, Ghyslaine Martel-Planche <sup>g</sup>,  
Virginie Marcel <sup>g</sup>, Ernestina Aguiar <sup>b,h</sup>, Juliana Giacomazzi <sup>b,h</sup>,  
Ingrid Petroni Ewald <sup>b,h</sup>, Roberto Giugliani <sup>a,b,c,d,h</sup>,  
Pierre Hainaut <sup>g</sup>, Patricia Ashton-Prolla <sup>a,b,c,d,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisas Biológicas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Department of Genetics, UFRGS, Brazil

<sup>d</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Hospital Moínhos de Vento, Porto Alegre, Brazil

<sup>f</sup> Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil

<sup>g</sup> Molecular Carcinogenesis and Biomarkers Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

<sup>h</sup> 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@hcpa.ufrgs.br](mailto:pprolla@hcpa.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

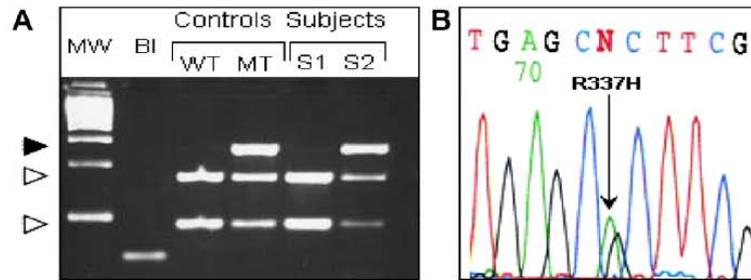


Fig. 1. Detection of R337H by restriction fragment length polymorphism and sequencing. DNA extracted from peripheral blood was amplified by PCR to generate a 238-base pair product encompassing exon 10 and flanking splice sites. (A) Restriction length fragment polymorphism (RFLP) analysis with HhaI. Black 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-unaaffected, 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

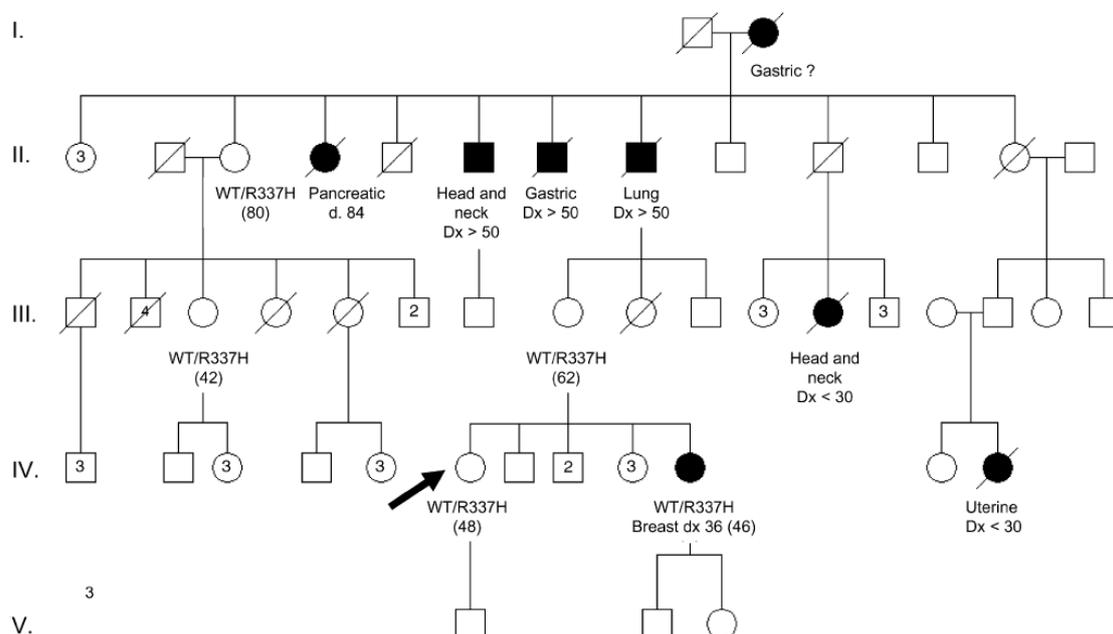


Fig. 2. Pedigree of the two asymptomatic R337H carriers participating in a mammography screening program (III.6 and IV.12). Cancer-affected individuals are shown in blackened symbols. Arrow indicates proband; current age is indicated in parenthesis. Dx, age at diagnosis; d, age at death; WT, wild-type.

families may remain unaffected throughout life. On the other hand, some families with R337H appear to develop familial syndromes of the LFS/LFL type. In between, some R337H families present tumor patterns that show only one of the LFS/LFL traits, such as an excess of childhood ADC. It is therefore likely that other, yet unidentified genetic factors may act as modifiers of R337H penetrance and phenotype.

To our knowledge, this is the first study to report detection of a germline *TP53* mutation associated with an increased risk of developing several types of cancer in a population-based screening program. So far, individuals with germline *TP53* mutations have been detected in the course of genetic testing for high-risk families reporting to a cancer genetics clinic on the basis of a suspicious family history. These results suggest that the R337H allele may be present in a small but significant proportion of the general population in Southern Brazil, raising new, unprecedented clinical and ethical challenges. On the basis of current knowledge, however, care should be exercised in the detection, information and management of subjects who are R337H carriers. The strict follow-up as recommended in LFS/LFL families should be proposed only if justified

by familial history. Surveillance should take into account the possibility of an increased risk of multiple cancers, and not exclusively childhood ADC. In particular, initiatives for testing children in a population-based setting for identifying subjects at risk for childhood ADC should be reviewed with extreme caution because of the ethical and clinical implications over the lifetime of subjects who would be detected as R337H carriers. It is therefore essential to focus efforts on assessing the risk of cancer associated with R337H carriage, and on identifying modifiers that may help to better predict who could be at higher risk among R337H carriers.

#### Acknowledgements

The Núcleo Mama 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 thank Drs. Dakir Duarte Filho, Ademar José Bedin Júnior and Fávio Marcel Telis Gonzalez, Patricia Izetti Lisbôa Ribeiro, Giovana Skonieski, Bernardete Weber and other members of the

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. E.I. 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. Kupsky, 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.

## 7.14. Produção científica relacionada. Ashton-Prolla *et al.* 2009.

**BMC Cancer**



This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

### **Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care.**

*BMC Cancer* 2009, **9**:283 doi:10.1186/1471-2407-9-283

Patricia Ashton-Prolla (pprolla@hcpa.ufrgs.br)  
Juliana Giacomazzi (jgiacomazzi@hcpa.ufrgs.br)  
Aishameriane V Schmidt (aishameriane.schmidt@ufrgs.br)  
Fernanda L Roth (floth@brturbo.com.br)  
Edenir I Palmero (palmeroe@fellows.iarc.fr)  
Luciane Kalakun (lmazayub@orion.ufrgs.br)  
Ernestina S Aguiar (esaguiar@hcpa.ufrgs.br)  
Susana M Moreira (surammstein@yahoo.com.br)  
Erica Batassini (ericabatassini@hotmail.com)  
Vanessa Belo-Reyes (beloreyes@gmail.com)  
Lavinia Schuler-Faccini (schuler.faccini@me.com)  
Roberto Giugliani (rgiugliani@hcpa.ufrgs.br)  
Maira Caleffi (maira.caleffi@hmv.org.br)  
Suzi ALVES Camey (camey@mat.ufrgs.br)

**ISSN** 1471-2407

**Article type** Research article

**Submission date** 19 January 2009

**Acceptance date** 14 August 2009

**Publication date** 14 August 2009

**Article URL** <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/283>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

© 2009 Ashton-Prolla *et al.*, licensee BioMed Central Ltd.  
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

---

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

© 2009 Ashton-Prolla *et al.*, licensee BioMed Central Ltd.  
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>),  
which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care.

Patricia Ashton-Prolla<sup>1-7</sup>, Juliana Giacomazzi<sup>2,3,4,6</sup>, Aishameriane V Schmidt<sup>8</sup>, Fernanda L Roth<sup>3,6</sup>, Edenir I Palmero<sup>1-3</sup>, Luciane Kalakun<sup>3,9</sup>, Ernestina S Aguiar<sup>2,3,4,6</sup>, Susana M Moreira<sup>3,7</sup>, Erica Batassini<sup>3,9</sup>, Vanessa Belo-Reyes<sup>3,6</sup>, Lavinia Schuler-Faccini<sup>1,4,5,7</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,4,5-7</sup>, Maira Caleffi<sup>3</sup> and Suzi Alves Camey<sup>9,10</sup>

(1) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

(2) Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

(3) Núcleo Mama Porto Alegre, Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil

(4) Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brazil.

(5) Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

(6) Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

(7) INAGEMP, Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil.

(8) Bolsista PROPESQ, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

(9) Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

(10) Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

Serviço de Genética Médica Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Centro de Pesquisas, 3º andar

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 Porto Alegre RS

Brazil

e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br

Tel.: + 55 51 3359-8011

Fax: + 55 51 3359-8010

PAP: pprolla@hcpa.ufrgs.br; JG: jgiacomazzi@hcpa.ufrgs.br; AVS: aishameriane.schmidt@ufrgs.br; FLR: floth@brturbo.com.br; EIP: palmeroe@fellows.iarc.fr; LK: mazayub@orion.ufrgs.br; ESA: esaguiar@hcpa.ufrgs.br; SMM: surammstein@yahoo.com.br; EB: ericabatassini@hotmail.com; VBR: beloreyes@gmail.com; LSF: schuler.faccini@me.com; RG: rgiugliani@hcpa.ufrgs.br; MC: maira.caleffi@hmv.org.br; SAC: camey@mat.ufrgs.br

## ABSTRACT

**Background.** Breast cancer is a significant public health problem worldwide and the development of tools to identify individuals at-risk for hereditary breast cancer syndromes, where specific interventions can be proposed to reduce risk, has become increasingly relevant. A previous study in Southern Brazil has shown that a family history suggestive of these syndromes may be prevalent at the primary care level. Development of a simple and sensitive instrument, easily applicable in primary care units, would be particularly helpful in underserved communities in which identification and referral of high-risk individuals is difficult.

**Methods.** A simple 7-question instrument about family history of breast, ovarian and colorectal cancer, FHS-7, was developed to screen for individuals with an increased risk for hereditary breast cancer syndromes. FHS-7 was applied to 9218 women during routine visits to primary care units in Southern Brazil. Two consecutive samples of 885 women and 910 women who answered positively to at least one question and negatively to all questions were included, respectively. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values were determined.

**Results.** Of the 885 women reporting a positive family history, 211 (23.8%; CI95%: 21.5-26.2) had a pedigree suggestive of a hereditary breast and/or breast and colorectal cancer syndrome. Using as cut point one positive answer, the sensitivity and specificity of the instrument were 87.6% and 56.4%, respectively. Concordance between answers in two different applications was given by a intra-class correlation (ICC) of 0.84 for at least one positive answer. Temporal stability of the instrument was adequate (ICC = 0.65).

**Conclusions.** A simple instrument for the identification of the most common hereditary breast cancer syndrome phenotypes, showing good specificity and temporal stability was developed and could be used as a screening tool in primary care to refer at-risk individuals for genetic evaluations.

## BACKGROUND

According to the World Cancer Report, cancer rates will increase by 50% from 10 million new cases estimated for the year 2000 to 15 million new cases per year in 2020. However, the report also provides evidence that efforts in the control of risk factors and public health strategies to increase surveillance and thus promote early cancer detection could prevent as many as one third of cancers diagnosed in the world [1,2].

Among women, breast cancer (BC) is the most prevalent malignant tumor, and one in four cancers diagnosed in women worldwide is a cancer of the female breast. More than 1.1 million women are diagnosed each year with the disease and its incidence rates are still increasing in many countries [2,3]. In Brazil, BC is a significant public health problem, due to its morbidity, and high incidence and mortality rates. About half of the affected women are diagnosed in advanced stages and not surprisingly, mortality rates are still increasing [4,5]. The State of Rio Grande do Sul (RS) has one of the highest BC incidence rates of the country with a predicted rate of 85.50 per 100,000 estimated for the year of 2008 – which is comparable to the USA and North Europe. The State's capital, Porto Alegre, has an even higher BC incidence rate, with 119.72 new cases per 100,000 women [4].

Positive family histories of BC and other tumors are associated with an increased risk for developing the disease and are recognized as indicators for the identification of high-risk, genetically predisposed individuals [6,7]. Overall, an estimated 5-10% of all breast cancers is hereditary, i.e., caused by a germline mutation in a predisposition gene that confers to its carrier a significantly higher cancer risk. Data on the prevalence of hereditary breast cancer in Brazil is scarce, and although founder mutations in cancer predisposition genes have been described in the country, there is no evidence for increased frequency of hereditary cancer syndromes in the Brazilian population [8, Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Calvez-Kelm FL, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P, Landi S, Tavtigian SV,

Hainaut P, Achatz MI. High frequency of the cancer-predisposing *TP53* mutation p.R337H in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect, submitted to *Human Mutation*]. Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes are related to an increased risk for breast, ovarian and other cancers in the autosomal dominant Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) syndrome [9,10]. Clinically significant *BRCA* mutations are estimated to occur in 1 in 300 to 500 persons in the general population [11]. Other BC predisposition genes, such as *TP53* (associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes, LFS/LFL), *PTEN* (associated with Cowden syndrome, CS) and *CHEK2* (associated with Hereditary Breast and Colorectal Cancer, HBCC) have been identified and are thought to have important, albeit lower contributions to hereditary breast cancer (HBC) [12-17]. Specific features in the family history may suggest the diagnosis of a hereditary breast cancer syndrome (HBCS) (i.e. pre-menopausal BC, male BC, bilateral BC and family history of BC and ovarian cancer - OC) [9,11].

Taking a family history has long been considered an integral part of the medical evaluation and is particularly important in genetic risk evaluation and risk management protocols, where it may ultimately help in the design of strategies to reduce cancer-associated mortality [18]. Health care providers have a professional and legal duty to obtain sufficient family history information to perform adequate cancer risk assessments [19,20]. However, despite its importance, information about the family history is not routinely or sufficiently collected outside the setting of cancer risk evaluation programs; in primary care, it has been described as a neglected area [21,22]. In addition, even among highly educated women, knowledge of HBC risk factors that could influence self-referral is usually scarce [23]

In Brazil, several barriers to the identification and counseling of individuals at-risk for HBCS have been identified and include lack of well established cancer genetic counseling services, absence of specific training programs in cancer genetics, small numbers of certified clinical geneticists and their unequal geographic distribution in the country [24]. The genetic cancer risk assessment process is an activity that requires specific training, in-depth knowledge of the subject, a

significant amount of time and a multidisciplinary approach. Although little is known about the efficacy and the cost-benefit relationship of community-based programs of identification of individuals at-risk for hereditary cancer, training of primary health care professionals and use of simple tools to facilitate the identification of these individuals may be helpful to ensure proper referrals and to optimize evaluations, especially in low resource countries [24,25].

In this study, a simple instrument to inquire about the family history of BC, OC and CRC was developed to identify women at-risk for HBCS during their primary care visits. We tested the instrument's sensitivity and positive and negative predictive values to identify different HBC phenotypes and its ability to identify women with higher lifetime risks for developing BC as estimated by current risk models.

## **METHODS**

### **Development of an instrument to identify women at risk for HBC in primary care**

In April of 2004, a population-based cohort study (the Núcleo Mama Porto Alegre – NMPOA Cohort) was started in 18 primary care units of the city of Porto Alegre, Southern Brazil [26,27]. The purpose was to collect demographic and epidemiologic data of a large sample of women and test a model for community-based BC screening in an underserved population that relies upon the *Programa Saúde da Família* (PSF or Family Health Program). This program was created in the mid-90's and is 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. The *Programa Saúde da Família* has expanded rapidly and nowadays provides health care to about half of the population [28-30].

To identify individuals and families at risk for HBC syndromes within the cohort, an instrument with seven questions, named FHS-7, was developed and applied to all women that

visited the participating primary care units from April 2004 to March 2006 (Table 1). FHS-7 was originally designed to identify women at-risk for the HBOC and included questions on features that have been associated with an increased likelihood of clinically significant *BRCA* mutations [11]. In addition, a question about family history of BC and/or CRC was included due to a previous suggestion of a higher than expect prevalence of such association in cancer genetic clinics of Porto Alegre [24]. Patients older than 18 years answering positively to at least one of these questions were referred to genetic cancer risk assessment (GCRA) where interviews with clinical geneticists and detailed pedigree analyses were performed. Ethical approval was obtained from the institutional ethics committees and patient inclusion required signature of informed consent.

#### **Patient recruitment and definition of study groups**

Of the 9218 women enrolled in the NMPOA cohort, 1285 (13.9%) women who visited the primary care units participating in the cohort, answered positively to at least one of the seven questions about family history of cancer in FHS-7 and those above age 18 years (1246) were referred for GCRA. Of these, 902 women from 829 families were seen for GCRA during a period of three years (2005-2007), and 885 agreed to participate in the study presented here (Figure 1). Study subjects included: (a) 885 unrelated women with a positive family history of cancer and (b) 910 unrelated women of the same cohort who denied a family history of cancer. Women in these two groups answered FHS-7 in their primary care units and confirmed the family history during a genetic evaluation session in a specialized health care center (NMPOA). In addition, a separate random sample (n=171) of women participating in the cohort completed FHS-7 twice (at recruitment in the primary care unit and during their mammographic screening visit at the same specialized health care center, NMPOA). The random selection was done among those individuals whose time interval between the first interview at the primary care units and second interview during routine mammographic screening was less than 30 days.

### **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 using standard methods. Confirmation of the cancer family history was attempted in all cases and pathology reports, medical records and/or death certificates were obtained whenever possible.

**a) Lifetime breast cancer risk estimates (LBCRE):** were obtained using the Claus Tables and the Gail and Tyrer-Cuzick models [31-33]. Upper age limit considered for the three LBCRE is 79, 90 and 80 years, respectively.

**b) Patients at high-risk for a hereditary breast cancer syndrome (HBC):** all patients fulfilling criteria for a BC predisposition syndrome upon pedigree analysis were classified in this group. Criteria for the definition of HBC syndromes are detailed below. For the HBOC syndromes, the American Society of Clinical Oncology (ASCO) criteria were used [35,36]. In addition, prior probabilities of carrying a *BRCA1* or *BRCA2* mutation were determined for each patient using mutation prevalence tables and the Penn II mutation prediction model [35-37]. All pedigrees were reviewed by at least two clinical geneticists to assess presence of criteria for Li-Fraumeni syndrome, Li-Fraumeni-Like syndrome, HBCC or other cancer predisposition syndromes. For Li-Fraumeni syndrome, the original criteria described by Li and Fraumeni [12] were used; for Li-Fraumeni-Like syndrome, pedigrees were classified according to the criteria of Birch [13] and Eeles [14] and for HBCC, the Meijers-Heijboer and Nasseem criteria were used [15-38].

### **Statistical Analysis**

Intra-class correlation (ICC) were used to verify the agreement between results obtained by the instrument and the genetic cancer risk evaluation. In addition, ICC was used to measure agreement between answers to the instrument when applied in two different occasions, for temporal stability verification.

To determine the cutoff value for the original FHS-7 instrument, the ROC curve was used and the values for specificity and sensitivity were calculated. To compare the mean risk estimates obtained using the Gail, Claus and Tyrer-Cuzick models, t test for different samples was applied. In all analyses a significance level of 0.05 was considered and two-sided analyses were performed.

## RESULTS

Demographic and reproductive data of the sample studied are summarized in Table 2. The mean age at assessment was 47.7 years (SD = 11.7); the majority (73.5%) of women enrolled had up to eight years of education and the average number of years of education was 6.3 (SD = 3.2). Risk estimates were obtained for all women and the mean estimates for the entire group were 8.14% (CI95%: 8.07-8.21), 8.91% (CI95%: 8.85-8.98) and 7.02% (CI95%: 6.94-7.09) using the Gail, Claus and Tyrer-Cuzick models, respectively.

After application of FHS-7, 885 women responded affirmatively to at least one question: 375 women (42.4%) reported a first-degree family history of BC or OC, 109 (12.3%), bilateral BC, 10 (1.1%) male BC, 40 (4.5%) BC and OC double primary tumors, 557 (62.9%), BC under the age of 50 years, 222 (25.1%),  $\geq 2$  relatives with BC and/or OC and 222 (26.2%)  $\geq 2$  relatives with BC and/or CRC in their families.

Table 3 shows that there was strong agreement between answers to questions 1 and 5 and their corresponding family history after GCRA. Agreement was moderate between the answers to questions 2, 6 and 7 obtained in the primary care units and the corresponding family history obtained during the genetic evaluation. The ICC for the question 3 was weak and for the question 4 was immeasurable; and this was likely due to small number of the positive answers.

Regarding temporal stability of the instrument, ICC for each of the 7 questions were: 0.72 for BC or OC in a first-degree relative, 0.74 for BC diagnosed <50 years in a relative, 0.61 for  $\geq 2$  relatives with BC and/or OC, 0.38 for bilateral BC in a relative, 0.17 multiple BC and OC in a

relative and 0.47 for  $\geq 2$  relatives with BC and/or CRC in the family. For the question about multiple BC and OC in a relative there were only 5 positive answers in GCRA. For the male BC question there was no positive answer and thus, the ICC coefficient could not be calculated. When considering the instrument as a whole, the presence of at least one positive answer in both instrument applications had an ICC of 0.65.

Application of FHS-7 in primary care units to screen for HBC phenotypes resulted in the identification of 211/885 individuals (23.8%; CI95%: 21.5-26.2) with a family history fulfilling such diagnoses, including the HBOC, HBCC and Li-Fraumeni-Like syndromes; no patient reported a family history consistent with Li-Fraumeni syndrome. In contrast, only 30/910 (3.3%; CI95%: 2.9-3.7) individuals that responded negatively to all of the 7 questions of the instrument had criteria for one or more of such phenotypes upon GCRA (Table 3). Overall, in a primary care setting, using weighted estimation, 6.2% (IC95%: 5.7-6.6) of women had a phenotype of one of the HBCS. Figure 2 show that the best cut point is 1, since it has the highest sensitivity and negative predictive value. In addition, the positive predictive value decreases when we consider 6 as cut point. This is unexpected, but occurs because there is no case with six or more affirmative answers. Table 4 describes the ability of FHS-7 to identify women with different clinical criteria for HBCS by family history using a cut point = 1.

## **DISCUSSION**

Although the family history of cancer is the single most important tool for the initial identification of hereditary cancer syndromes and usually does not require any sophisticated technologies, little attention and time is usually spent to obtain a detailed pedigree in routine clinical practice. Even in tertiary health care institutions, recording of a comprehensive pedigree is uncommon. Most health care professionals outside clinical genetics are not trained to obtain a detailed family history, usually do not have sufficient time and do not recognize the power of this simple tool for disease identification and prevention [39]. In fact, reported family history of cancer,

especially when in first-degree relatives appears to be quite reliable, and such reliability may exist regardless of educational level of the informant [21]. Since most at-risk families are identified *first* by a primary health care professional, development of simple tools to facilitate the identification of such families at the primary care level can be useful and effective to optimize referrals [40,41], especially in low resource countries. In this study, we developed and validated a simple family history questionnaire, FHS-7, for application at the primary care level and used a cut point of at least one positive question to determine referral for genetic evaluation by a trained specialist.

Overall, in the process of instrument validation, most of the women responding positively to at least one of the seven questions at the primary care units had also at least one positive finding regarding the same seven family history features identified during GCRA by a trained clinical geneticist. This indicates that there is a good agreement between the information obtained with the instrument in primary care and the information obtained during GCRA. For some of the questions, such as those inquiring about a family history of male BC and multiple primary (breast and ovarian) tumors, the ICC was very low and this may be a consequence of the small number of positive answers obtained for these questions. An additional reason that may partially explain some of the low ICC values is that upon retrieval of confirmatory documents during GCRA, some of the cancer diagnoses were not confirmed. This occurred particularly often in the multiple primary cases, and in those, OC was usually not confirmed. Uncertainty about the cancer family history, especially when there is more than one cancer diagnosis in the family, may also be frequent at the first visit in the primary care unit and may be confirmed or refuted before the genetic evaluation. Another concern would be a potential bias of ascertainment due to non-inclusion of women who did not attend genetic cancer risk assessment sessions. In fact, the demographic data of women with a positive family history who underwent GCRA (attenders) differed significantly in some aspects from those of women who did not undergo GCRA (non-attenders). Non-attenders were generally younger, less educated, and had undergone a breast biopsy less often than attenders ( $p < 0.001$ ), as demonstrated elsewhere. However, for most of the questions in the family history questionnaire, there was no

significant difference between the proportion of positive answers between attenders and non-attenders [27].

Regarding the ability of FHS-7 to identify particular HBC phenotypes, the presence of at least one positive answer was associated with good sensitivity at acceptable specificity. This was particularly the case for the identification of the HBOC phenotype, and less for the Li-Fraumeni-Like phenotype, however, the instrument was not originally developed to identify Li-Fraumeni-Like families. The worst performance was in the identification of Li-Fraumeni-Like families and all of them were defined as Li-Fraumeni-Like by Eeles criteria only [42]. These findings indicate that individuals with family history features suggesting Li-Fraumeni syndrome variants, especially those fulfilling the more relaxed criteria of Eeles may be missed by the instrument. Since the major goal of using the instrument was to correctly identify HBC phenotypes in general, the very high negative predictive values obtained considering cut point 1 was highly satisfactory, even if this required evaluation of a larger number of individuals to ensure that only a very small fraction of high-risk cases remain unidentified. The relatively low specificity of FHS-7 must be considered as a potential limitation for this study. However, if one considers the context of the study, including the low cost involved in the application of the instrument as well as of clinical genetic evaluations, and the added significant benefit of identification of a true hereditary breast cancer family, in which several at-risk individuals may benefit from further genetic testing and screening interventions, the low specificity becomes less important. An additional limitation of the study is that we have not considered limited family structure in the pedigree analyses. Weitzel *et al.* (2007) [43] have recently described an increased prevalence of germline mutations in women diagnosed with early-onset breast cancer, who may not fulfill well-established criteria for a hereditary breast cancer syndrome because of the lack of females in either lineage. If this would have been considered, prevalence of phenotype-positive cases would have likely increased.

A significant proportion of women from the community-based sample studied here presented a family history of BC, OC and/or CRC and upon genetic risk evaluations: 6.2% of them

had phenotypes of specific BC predisposition syndromes. These results have been reported elsewhere in detail in [27]. Even considering that the majority of families with family histories of a hereditary breast cancer syndrome fulfilled the more relaxed criteria for Li-Fraumeni-like syndrome, the identification of such families may still be relevant since this geographic has been identified as a region with high prevalence of a specific *TP53* germline mutation.

## CONCLUSION

In conclusion, simple family history questionnaires such as the one developed here can be used in BC risk-screening programs at the primary care level as important tools for the identification of individuals who may benefit from specific interventions.

**Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Authors` contributions:** PAP, EIP, LK and MC developed the initial design of the genetics study within the cohort. JG, FLR, EA, SMM, EB and VBR contributed to data acquisition and handling. PAP, JG, AVS and SC were responsible for data analysis, and interpretation. All authors revised the manuscript and agreed with the final submitted version of the manuscript.

**Acknowledgements:** The Núcleo Mama Porto Alegre – NMPOA 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, Karen Barboza de Pereira, Diego Pasetto, and the NMPOA team for their help with the recruitment, evaluation and follow-up of the patients included in this study. 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), FAPERGS (grant number PPSUS-II 0700964) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior (CAPES - PRODOC grant number 00202/03-7) to P.A-P. EIP was supported in part by grants from The International Agency for Research in Cancer (IARC) and CNPq (process number 203732/2005-7); JG was supported by a fellowship from CAPES and AVS received an undergraduate grant from the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (PIBIC, Propesq-UFRGS).

## REFERENCES

1. World Health Organization Webpage [<http://www.who.int>]
2. Cancer Research UK [<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/geographic/world/commoncancers/>]
3. Tavassoli FA, Devilee P (Eds.): **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.** IARC Press: IARC Press: Lyon 2003.
4. Brazilian National Cancer Institute [<http://www.inca.gov.br>]
5. 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**:1785-1790.
6. Hall IJ, Burke W, Coughlin, *et al.*: **Population-Based Estimates of the Prevalence of Family History of Cancer Among Women.** *Community Genet* 2001, **4**:134-142.
7. Eberl MD, Sunga A, Farrel C, *et al.*: **Patients with a family history of cancer: identification and management.** *J Am Board Fam Medicine* 2005, **18**:211-217.
8. Da Costa EC, Vargas FR, Moreira AS, *et al.*: **Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast ovary cancer syndrome.** *Cancer Genet Cytogenet* 2008, **184**:62-6.
9. Garber JE, Offit K: **Hereditary cancer predisposition syndromes.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:276-292.
10. Online Mendelian Inheritance in Man Webpage [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&cmd=search&term>]
11. 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.
12. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, *et al.*: **A cancer family syndrome in twenty-four kindreds.** *Cancer Res* 1988, **48**:5358-5362.
13. 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.
14. Eeles RA: **Germline mutations in the TP53 gene.** *Cancer Surv* 1995, **25**:101-124.
15. 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.
16. 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.

17. Eng C: **The real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria.** *J Med Genet* 2000, **37**:828-30.
18. Allen HJ, Briceno CA, Piver MS: **Assessment of family cancer history collection and utilization in patient care.** *Community Genet* 1998, **1**:237-242.
19. Murff H J, Byrne D, Syngal S: **Cancer Risk Assessment: Quality and Impact of the Family History Interview.** *Am J Prev Medicine* 2004, **27**:239-245.
20. Offit K, Groeger E, Turner S, *et al.*: **The "duty to warn" a patient's family members about hereditary disease risks.** *JAMA* 2004, **292**:1469-1473.
21. Roth FL, Camey SA, Caleffi M, *et al.*: **Consistency of self-reported first-degree family history of cancer: a population-based study.** *Familial Cancer* 2009 Jan 20. [Epub ahead of print].
22. Ramsey SD, Yoon P, Moonesinghe, *et al.*: **Population-based study of the prevalence of family history of cancer: Implications for cancer screening and prevention.** *Genet Med* 2006, **8**:571-575.
23. Katapodi MC, Aouizerat BE: **Do women in the community recognize hereditary and sporadic breast cancer risk factors?** *Oncol Nurs Forum.* 2005, **32**:617-623.
24. 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**:363-371.
25. Daly MB, Stearmen B, Masny A, *et al.*: **How to establish a high-risk cancer genetics clinic: limitations and successes.** *Curr Oncol Rep.* 2005, **7**:469-474.
26. Caleffi M, Ribeiro RA, Duarte Filho DL, *et al.*: **A model to optimize public health care and downstage breast cancer in limited-resource populations in southern Brazil. (Porto Alegre Breast Health Intervention Cohort).** *BMC Public Health.* 2009, **9**:83.
27. Palmero EI, Caleffi M, Schüller-Faccini L, *et al.*: **Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in Southern Brazil.** Accepted in *Genetics and Molecular Biology* 2009, **32**.
28. Ramalho AS and Silva RB: **Community genetics: a new discipline and its application in Brazil.** *Cad Saude Publica* 2000, **16**:261-263.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Claus EB, Risch N, Thompson D. **Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction.** *Cancer* 1994, **73**:643-651.

33. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 2005, **23**:1111-1130. Erratum in: *Stat Med* 2005, **24**:156.
34. National Comprehensive Cancer Network. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Clinical Practice Guidelines in Oncology [[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/genetics\\_screening.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/genetics_screening.pdf)]
35. ASCO Subcommittee on Genetic Testing for Cancer Susceptibility: Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* 2006, **14**:1730-1736.
36. Penn II Mutation Prediction Model [<http://www.afcri.upenn.edu/itacc/penn2/>]
37. Parmigiani G, Chen S, Iversen ES, *et al.*: Validity of models for predicting *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *Ann Intern Med* 2007, **147**:441-450.
38. Naseem H, Boylan J, Speake D, *et al.*: Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of *CHEK2* compared with high-penetrance genes. *Clin Genet* 2006, **70**:388-395.
39. Penchaszadeh VB: Community genetics in Latin America: challenges and perspectives. *Community Genet* 2000, **3**:124-127.
40. Hughes KS, Roche C, Campbell CT, *et al.*: Prevalence of family history of breast and ovarian cancer in a single primary care practice using a self-administered questionnaire. *Breast J* 2003, **1**:19-25.
41. 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**:1769-1776.
42. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, *et al.*: Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 2009, **27**:1250-1256.
43. Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, *et al.*: Limited Family Structure and *BRCA* Gene Mutation Status in Single Cases of Breast Cancer. *JAMA* 2007, **297**:2587-2595.

**Figure 1 – Overview of the questionnaire validation procedure and its results.**

NMPOA= Nucleo Mama Porto Alegre cohort; FH = family history; BC= breast cancer; OC= ovarian cancer; CRC = colorectal cancer; GCRA = genetic cancer risk assessment; BCPS= breast cancer predisposition syndrome; PCU= primary care unit.

**Figure 2 - Specificity, sensitivity, positive and negative predictive values and their respective 95% confidence intervals, for each of different cut points used for the identification of the hereditary breast cancer phenotype.**

PPV= positive predictive value; NPV= negative predictive value.

**Table 1 – The FHS-7 questionnaire: intra-class correlation (ICC) between responses to individual questions in two settings: primary care unit (PCU) and immediately before genetic cancer risk assessment (GCRA) and total of positive answers at GCRA interview.**

#	Question	Positive answers	ICC (PCU/GCRA)
1	Did any of your 1 <sup>st</sup> degree relatives have breast <i>or</i> ovarian cancer?	348 (19.4%)	0.87
2	Did any of your relatives have bilateral breast cancer?	84 (4.7%)	0.56
3	Did any man in your family have breast cancer?	2 (0.1%)	0.33
4	Did any woman in your family have breast <i>and</i> ovarian cancer ?	5 (0.3%)	0.08
5	Did any woman in your family have breast cancer before the age of 50 years?	537 (29.9%)	0.79
6	Do you have 2 or more relatives with breast <i>and/or</i> ovarian cancer ?	221 (12.2%)	0.58
7	Do you have 2 or more relatives with breast <i>and/or</i> bowel cancer ?	251 (14.0%)	0.53

**Table 2 - Demographics and variables of the women enrolled in this study.**

	Women reporting a FH <sup>1</sup> of cancer in PCU <sup>2</sup> (n=885)		Women without FH <sup>1</sup> report of cancer in PCU <sup>2</sup> (n=910)	
	N(%)	Mean(SD)	N(%)	Mean(SD)
<b>Age at assessment</b>	-	43.9 (12.7)	-	51.4 (9.2)
<b>BMI</b>				
≤18.5	5 (0.6)	-	12 (1.3)	-
18.51-25	293 (33.6)	-	232 (25.5)	-
25.01-30	291 (33.3)	-	362 (39.8)	-
>30	284 (32.5)	-	304 (33.4)	-
<b>Age at menarche</b>	-	12.7 (1.7)	-	13.0 (1.7)
<b>Parity</b>				
No children	107 (12.2)	-	65 (92.7)	-
One or more children	777 (87.8)	-	844 (7.2)	-
<b>Age at birth of first child</b>	-	21.5 (5.0)	-	21.7 (5.2)
<b>Reproductive Status</b>				
Pre-menopausal	574 (64.9)	-	448 (50.3)	-
Post-menopausal	311 (35.1)	-	458 (49.7)	-
<b>Age at menopause</b>	-	47.0 (5.4)	-	46.8 (5.5)
<b>Previous biopsy</b>	78 (8.8)	-	66 (7.3)	-
<b>Hormone replacement therapy</b>	72 (8.1)	-	99 (10.9)	-
<b>Consanguinity<sup>‡</sup></b>	64 (7.4)	-	53 (5.8)	-

Legend:

<sup>1</sup> FH = Family History

<sup>2</sup> PCU = Primary Care Unit.

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

**Table 3 - Total number of women fulfilling different criteria for hereditary breast cancer syndromes in both study groups.**

	Women reporting a FH <sup>1</sup> of cancer in PCU <sup>2</sup> (n=885)		Women with a negative FH <sup>1</sup> for cancer in PCU <sup>2</sup> (n=910)	
	n	%	n	%
ASCO criteria for HBOC syndrome <sup>3</sup>	64	7.2	2	0.2
High risk HBOC syndrome <sup>4</sup>	75	8.5	2	0.2
HBCC criteria <sup>3</sup>	26	2.9	0	0.0
LFL syndrome <sup>3</sup>	141	16.0	29	3.2
HBC syndrome (overall) <sup>5</sup>	211	23.8	30	3.3

Legend:

<sup>1</sup> FH = Family History

<sup>2</sup> PCU = Primary Care Unit.

<sup>3</sup> Criteria as described in materials and methods.

<sup>4</sup> ASCO criteria and/or prior probability of a BRCA mutation  $\geq 30\%$  using Myriad mutation prevalence tables and the Penn II mutation prediction model.

<sup>5</sup> Includes Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC), Hereditary Breast and Colorectal Cancer (HBCC) and Li-Fraumeni-like syndrome (LFL) criteria.

**Table 4 - Ability of the FHS-7 to identify women with clinical criteria (family history) for hereditary breast cancer syndromes (n = 1795).**

Criteria	AUC (CI 95%)	Cut point = 1			
		Sensitivity (CI 95%)	Specificity (CI 95%)	PPV <sup>1</sup> (CI 95%)	NPV <sup>2</sup> (CI 95%)
ASCO criteria <sup>3</sup>	0.85 (0.81-0.89)	97.0 (91-100)	52.0 (50-55)	7.0 (6-9)	100.0 (99-100)
High risk HBOC syndrome <sup>4</sup>	0.86 (0.82-0.90)	97.0 (92-100)	53.0 (50-55)	8.0 (7-10)	100.0 (99-100)
HBCC criteria <sup>3</sup>	0.86 (0.84-0.88)	100.0 (89-100)	51.0 (49-54)	3.0 (2-4)	100.0
LFL syndrome <sup>3</sup>	0.72 (0.68-0.76)	83.0 (77-88)	54.0 (52-56)	16.0 (14-18)	97.0 (96-98)
HBC syndrome (overall) <sup>5</sup>	0.83 (0.81-0.85)	88.0 (83-91)	56.0 (54-59)	24.0 (21-27)	97.0 (95-98)

Legend:

<sup>1</sup> PPV = positive predictive value.

<sup>2</sup> NPV = negative predictive value.

<sup>3</sup> Criteria as described in materials and methods.

<sup>4</sup> ASCO criteria and/or estimated prior probability of a BRCA mutation  $\geq 30\%$ .

<sup>5</sup> Includes Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC), Hereditary Breast and Colorectal Cancer (HBCC) and Li-Fraumeni-like syndrome (LFL) criteria.

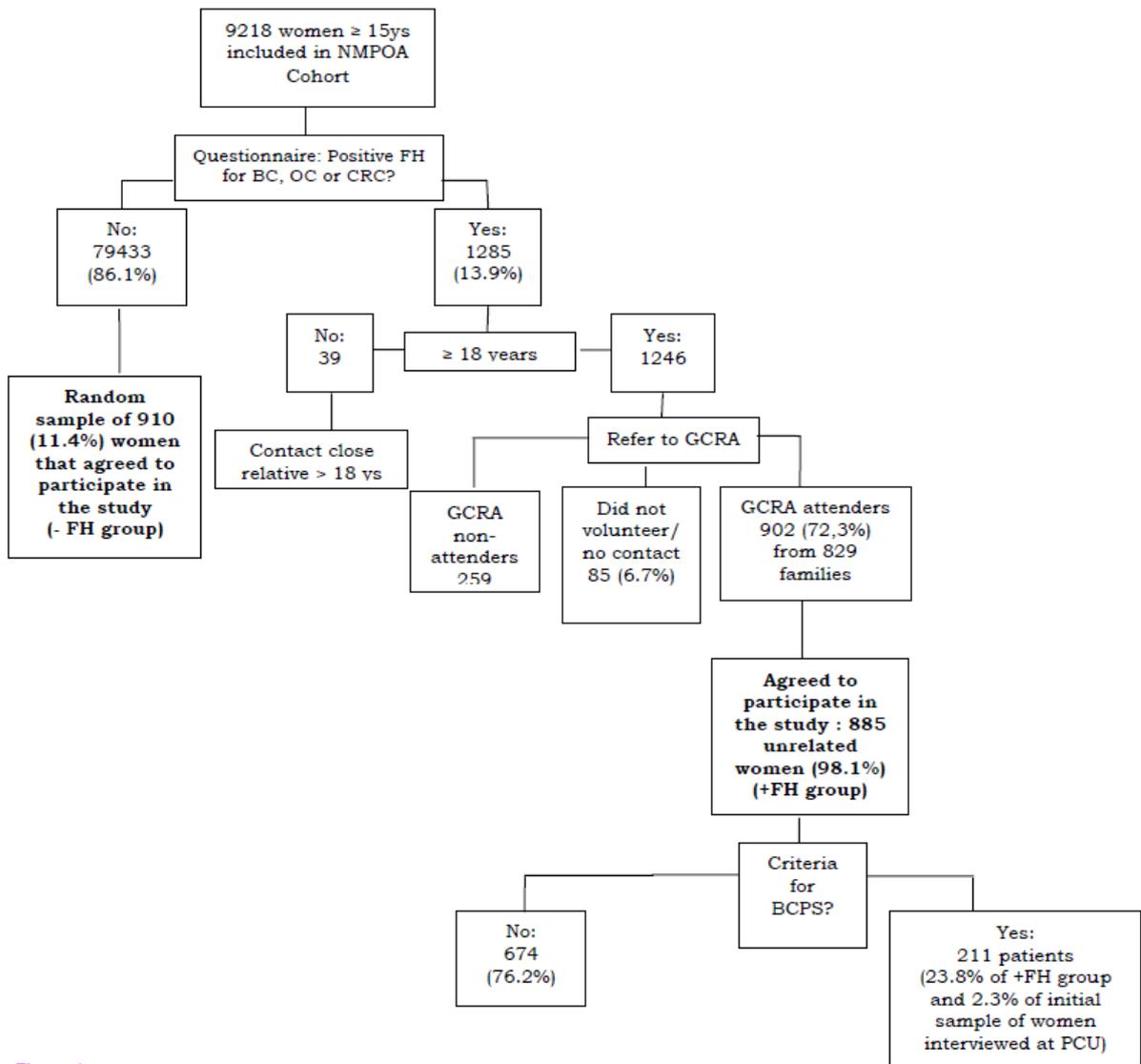


Figure 1

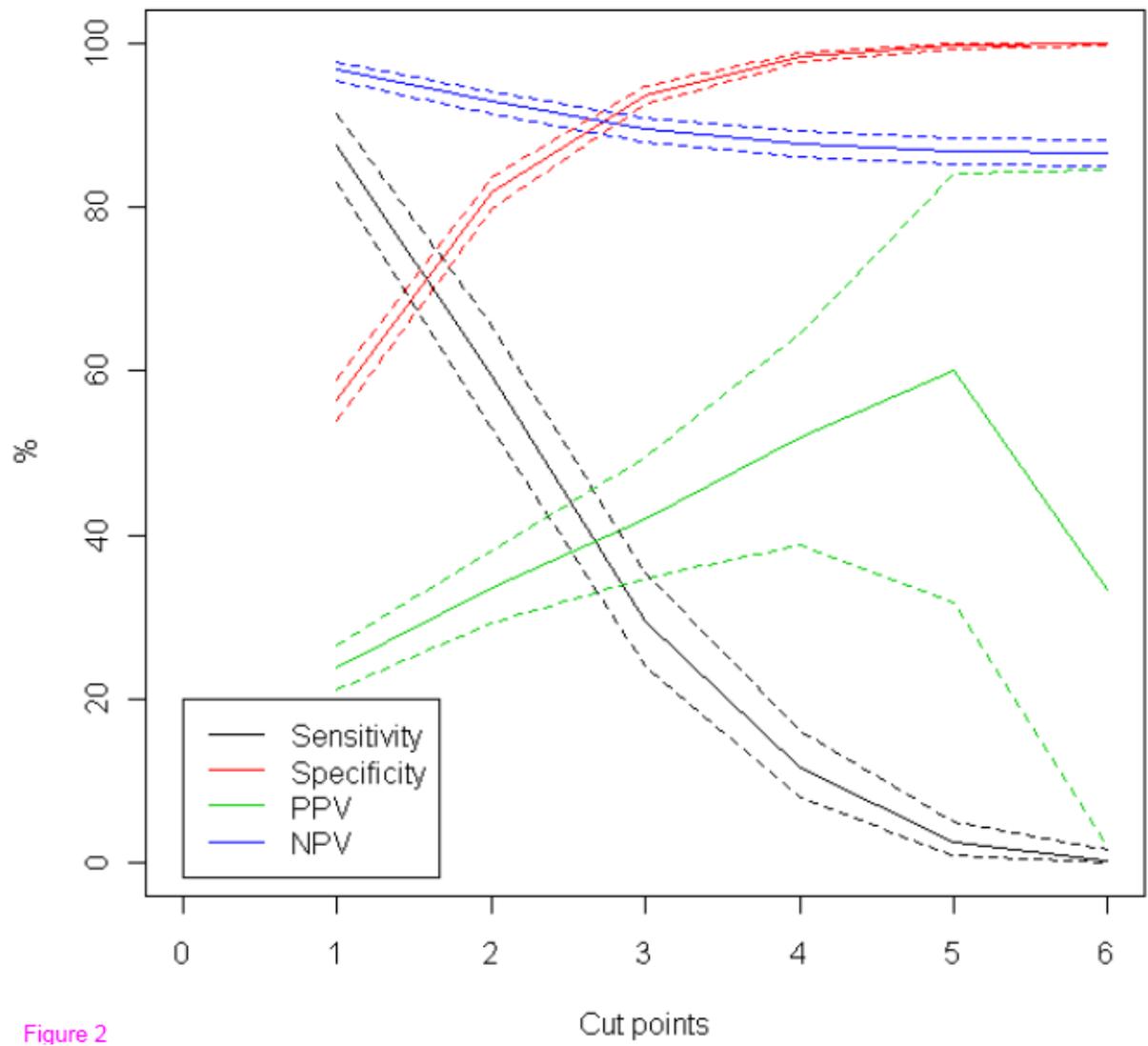


Figure 2