

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**POLIMORFISMOS  
EM GENES ASSOCIADOS À APOPTOSE  
E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA  
PARA O CANCRO DA MAMA**

**Germana Andreia Taipa Leandro Domingues**

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**POLIMORFISMOS  
EM GENES ASSOCIADOS À APOPTOSE  
E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA  
PARA O CANCRO DA MAMA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ORIENTADA PELOS PROFESSORES DOUTORES

Jorge Francisco Dias Rodrigues Gaspar, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Pedro João Neves e Silva, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Germana Andreia Taipa Leandro Domingues**

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2008

*Uns, com os olhos postos no passado,  
Vêem o que não vêem; outros, fitos  
Os mesmos olhos no futuro, vêem  
O que não pode ver-se.*

*Por que ir tão longe pôr o que está perto –  
A segurança nossa? Este é o dia,  
Esta é a hora, este é o momento, isto  
É quem somos, e é tudo.*

Ricardo Reis, 1933

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Rueff pelo acolhimento caloroso e apreço especial que sempre demonstrou pela parte humana de todos com quem trabalha.

Ao Professor Doutor Jorge Gaspar agradeço a orientação que me deu e a boa disposição com que encara o trabalho.

Ao Professor Doutor Pedro Silva pela orientação e disponibilidade sempre demonstrada.

Aos Professores Doutores Dinis Pestana e Maria Antónia Turkman pela ajuda fulcral que me deram na análise estatística do meu trabalho e pela prontidão com que me auxiliaram.

À Susana por me ter acompanhado sempre ao longo destes três anos, mostrando-me os caminhos a seguir e acompanhando o meu crescimento profissional, sempre com as suas achegas de mamã extremosa.

Aos meus colegas de trabalho: ao Bruno pelo profissionalismo com que encara tudo na sua vida, ao João pelas palhaçadas que me animaram quando mais precisei e à Rita pela nossa telepatia! Um muito obrigado aos três, por terem permitido que os meus dias mais cinzentos se transformassem num arco-íris.

À Marta, por ser tão implicativa e persistente como eu, e por ter ido muito mais além da apenas madrinha. Obrigada por me compreenderes tão bem!

Às Crubélias: à Cat pela sua visão demasiado pés assentes na terra, à Pé pelas maluquices desvairadas e à Pá por ser uma narizinho empinado que se desmancha facilmente. Obrigada meninas, porque este é o culminar de todos os anos que passámos nesta Faculdade, todas as angústias superadas, todas as mágoas reprimidas e todos os maravilhosos momentos que passámos juntas. A partir de agora a vida continua lá fora...

À Joana e à Rita, porque as amigas aparecem onde menos se espera e se prolongam sem qualquer esforço!

A todos os meus amigos que desde que entraram na minha vida se tornaram especiais e por mais tempo que passe, terão sempre um lugar especial reservado no meu coração!

Ao meu irmão por me ter acompanhado desde o meu primeiro passo e por me fazer crer que aconteça o que acontecer, ele lá estará!

Aos meus pais, por sempre me terem apoiado nas minhas decisões e por terem percebido desde cedo que este era o único caminho que me faria sentir concretizada!

## Resumo

Os polimorfismos em genes que codificam as proteínas envolvidas nas vias apoptóticas são fortes candidatos à associação com o cancro da mama, já que a apoptose é um processo altamente desregulado no processo da cancerigénese. Para avaliar a associação dos diferentes polimorfismos das vias apoptóticas seleccionados (*LTA* Cys13Arg; *LTA* Thr60Asn; *TNFRSF1B* Met196Arg; *CASP7* Arg249Lys; *CASP7* Asp255Glu; *CASP8* Asp302His; *CASP8* Tyr12STOP; *CASP9* Arg221Gln; *CASP9* Arg173His; *CASP9* Phe136Leu; *CASP9* Ala28Val; *CASP10* Ile522Leu e *TP53* Arg72Pro) com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama, realizou-se um estudo caso-controlo numa amostra da população caucasiana portuguesa composta por 286 pacientes e 546 controlos.

Após análise estatística verificou-se que o genótipo heterozigótico do polimorfismo *CASP10* Ile522Leu representa um possível factor que aumenta o risco para o desenvolvimento de cancro da mama ( $OR_{ajustado}=1.527$ ;  $IC=1.065-2.188$ ;  $p=0.021$ ). Também se verificam associações estatisticamente significativas entre o desenvolvimento de cancro da mama e alguns genótipos da associação *CASP8* Asp302His/*Tyr12STOP/CASP10* Ile522Leu, nomeadamente os genótipos GG/GT/TT ( $OR_{ajustado}=3.748$ ;  $IC=1.216-11.554$ ;  $p=0.021$ ); GG/TT/AT ( $OR_{ajustado}=4.399$ ;  $IC=1.454-13.312$ ;  $p=0.009$ ) e GC/GG/AT ( $OR_{ajustado}= 3.488$ ;  $IC=1.137-10.700$ ;  $p=0.029$ ), todos eles representando possíveis factores de aumento de risco.

Considerando estes resultados, verifica-se com este estudo uma possível associação de alguns polimorfismos em genes das vias apoptóticas com o risco para desenvolver cancro da mama. No entanto, são necessários mais estudos neste campo para que se possam comprovar estes resultados.

## Palavras-chave

Apoptose, Cancro da mama, SNP, Susceptibilidade Genética

## Abstract

Polymorphisms in genes encoding proteins involved in apoptotic pathways are held to be candidates for association with breast cancer, since apoptosis is a high dysregulated process in cancerigenesis. To evaluate the association of the selected apoptotic pathways polymorphisms (*LTA* Cys13Arg; *LTA* Thr60Asn; *TNFRSF1B* Met196Arg; *CASP7* Arg249Lys; *CASP7* Asp255Glu; *CASP8* Asp302His; *CASP8* Tyr12STOP; *CASP9* Arg221Gln; *CASP9* Arg173His; *CASP9* Phe136Leu; *CASP9* Ala28Val; *CASP10* Ile522Leu e *TP53* Arg72Pro) with the individual susceptibility for breast cancer development, was carried out a case-control study in a sample of the caucasian portuguese population with 286 patients and 546 controls.

After the statistical analysis was verified that the heterozigotic genotype of *CASP10* Ile522Leu polymorphism represents a possible factor that increases the risk of developing breast cancer [OR<sub>adjusted</sub>=1.527; CI=1.065-2.188; p=0.021]. It was observed positive associations between breast cancer development and some genotypes of the association *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP/*CASP10* Ile522Leu, in particular the genotypes GG/GT/TT (OR<sub>adjusted</sub>=3.748; CI=1.216-11.554; p=0.021); GG/TT/AT (OR<sub>adjusted</sub>=4.399; CI=1.454-13.312; p=0.009) and GC/GG/AT (OR<sub>adjusted</sub>=3.488; CI=1.137-10.700; p=0.029), representing some possible factors of an increasing risk.

After that, it was verified with this study a possible association of some polymorphisms in apoptotic pathways genes with the risk for breast cancer development. However, further studies are needed to support these results.

## Keywords

Apoptosis, Breast Cancer, SNP, Genetic Susceptibility

## Lista de abreviaturas

ALPS II	Síndrome Autoimune Linfoproliferativo tipo II
APAF-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i> (protease apoptótica factor de activação 1)
BAD	<i>BCL-2-Associated Death promoter protein</i> (proteína promotora de morte associada a BCL-2)
BAK	<i>BCL-2 homologous Antagonist/Killer</i> (antagonista homólogo de BCL-2)
BAX	Proteína membro da família BCL-2
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i> (célula B 2 do linfoma)
BCL-x <sub>L</sub>	<i>Basal Cell Lymphoma-extra large</i> (célula basal muito grande do linfoma)
BH3	<i>BCL-2 Homology domain number 3</i> (domínio número 3 homólogo de BCL-2)
BID	<i>BH3 Interacting Domain death agonist</i> (domínio de morte antagonista que interacciona com BH3)
BIK	<i>BCL-2 Interacting Killer</i> (inibidor da BCL-2)
BIM	<i>BCL-2-like 11 apoptosis facilitator</i> (facilitador da apoptose número 11 homólogo de BCL-2)
BMF	<i>BCL-2 Modifying Factor</i> (factor modificador da BCL-2)
BRCA1	<i>Breast Cancer susceptibility gene 1</i> (gene 1 para a susceptibilidade de cancro da mama)
BRCA2	<i>Breast Cancer susceptibility gene 2</i> (gene 2 para a susceptibilidade de cancro da mama)
CASP3	Caspase-3
CASP6	Caspase-6

CASP7	Caspase-7
CASP8	Caspase-8
CASP9	Caspase-9
CASP10	Caspase-10
CI	<i>Confidence Interval</i> (intervalo de confiança)
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i> (complexo sinalizador indutor de morte)
D'	Grau de desequilíbrio de <i>linkage</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
FADD	<i>FAS-Associated protein with Death Domain</i> (proteína associada a FAS com domínio de morte)
FAS	Receptor membro 6 da superfamília dos factores de necrose tumoral
FASL	Ligando de FAS
FHL	Linfocitose Hemofagocítica Familiar
HRK	<i>Harakiri, BCL-2 interacting protein</i> (proteína harakiri que interactua com BCL-2)
HW	Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
LTA	Linfotoxina Alfa
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> (frequência alélica mínima)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para a Informação Biotecnológica)
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i> (proteína 1 indutora de forbol-12-miristato-13-acetato)

NTC	<i>No Template Control</i> (controlo negativo)
NK	<i>Natural Killer cell</i> (célula natural killer)
OR	<i>Odds Ratio</i> (razão de excedências)
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacção em cadeia da polimerase)
PUMA	<i>TP53 Up-regulated Modulator of Apoptosis</i> (modulador da apoptose regulado positivamente pelo TP53)
rs	<i>Reference SNP</i> (referência do SNP)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (polimorfismo de um único nucleótido)
SNP ID	<i>Single Nucleotide Polymorphism Identification</i> (identificação do polimorfismo de um único nucleótido)
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i> (pacote estatístico para as ciências sociais)
tBID	<i>BH3 Interacting Domain death agonist truncated</i> (domínio truncado de morte antagonista que interactua com BH3)
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (factor de necrose tumoral alfa)
TNFRSF1B	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 1B</i> (membro 1B da superfamília dos receptores do factor de necrose tumoral)
TNF-R1	<i>Tumor Necrosis Factor - Receptor 1</i> (factor de necrose tumoral - receptor 1)
TNF-R2	<i>Tumor Necrosis Factor - Receptor 2</i> (factor de necrose tumoral - receptor 2)
TP53	<i>Tumor Protein 53</i> (proteína tumoral 53)

# Índice geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Palavras-chave .....	ii
Abstract .....	iii
Keywords .....	iii
Lista de abreviaturas .....	iv
Índice geral .....	vii
Índice de tabelas .....	ix
Índice de figuras .....	x
Introdução .....	1
Cancro .....	1
Cancro da mama e os seus factores de risco .....	1
Polimorfismos e cancro da mama .....	3
Apoptose .....	4
Objectivos do trabalho .....	8
Materiais e métodos .....	9
Amostragem da população de estudo .....	9
Extracção de DNA .....	9
Escolha dos polimorfismos .....	9
Genotipagem dos polimorfismos .....	11
Análise estatística .....	11
Resultados .....	12
Caracterização da amostra .....	12

Genotipagem dos polimorfismos .....	12
Análise estatística das frequências alélicas e genóticas dos diferentes polimorfismos ...	13
Análise estatística do grau de <i>linkage</i> entre os diferentes polimorfismos .....	15
Análise estatística da associação dos diferentes polimorfismos com o cancro da mama ...	16
Análise estatística das associações e interacções entre os diferentes polimorfismos .....	16
Análise estatística da associação das associações e interacções dos polimorfismos com o cancro da mama .....	19
Discussão.....	23
Críticas e perspectivas futuras .....	27
Referências bibliográficas .....	28
Anexos .....	I
Inquérito .....	I

## Índice de tabelas

Tabela I – Factores de risco para o cancro da mama (adaptado de Dumitrescu <i>et. al</i> 2005) .....	2
Tabela II – Alterações dos genes envolvidos na apoptose associados a doenças humanas (adaptado de Hajra <i>et. al</i> 2004; Müllauer <i>et. al</i> 2001 & Philchenkov <i>et. al</i> 2004) .....	4
Tabela III – Identificação dos polimorfismos em estudo: nome e localização do gene, identificação do SNP, sequência-alvo, alteração do nucleótido e consequente alteração do aminoácido e frequência alélica mínima (MAF) .....	10
Tabela IV – Distribuição das características da amostra .....	12
Tabela V – Distribuição das frequência genotípicas, da frequência alélica mínima (MAF) e dos <i>p-values</i> de HW dos casos e controlos, para cada polimorfismo .....	14
Tabela VI – Grau de desequilíbrio de <i>linkage</i> ( $D'$ ) entre os diferentes polimorfismos .....	15
Tabela VII – <i>Odds ratio</i> e intervalos de confiança a 95% para cada polimorfismo e para o número de alelos variantes nos casos e controlos .....	17
Tabela VIII – Distribuição das frequências genotípicas dos casos e controlos, para as diferentes associações e interacções .....	20
Tabela IX – <i>Odds ratio</i> e intervalos de confiança a 95% para as associações/interacções dos polimorfismos .....	22

## Índice de figuras

Figura 1 – Vias de activação da apoptose: intrínseca, extrínseca e da granzima B (adaptado de Taylor <i>et. al</i> 2008) .....	6
Figura 2 – Perfil da genotipagem do gene <i>CASP7</i> Asp255Glu, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Os homozigóticos marcados com VIC <sup>®</sup> correspondem ao genótipo CC, os homozigóticos marcados com FAM <sup>™</sup> correspondem ao genótipo GG e os heterozigóticos CG foram marcados com ambos os fluoróforos VIC <sup>®</sup> e FAM <sup>™</sup> .....	13
Figura 3 – Grau de desequilíbrio de <i>linkage</i> entre os diferentes polimorfismos da <i>CASP9</i> e respectivos <i>p-values</i> para casos (esquerda) e controlos (direita) .....	15

# Introdução

## Cancro

O cancro constitui um dos problemas biomédicos mais importantes, tendo por isso suscitado grande interesse a nível da investigação nos últimos tempos. Apesar de estar já comprovado o envolvimento de numerosos factores genéticos na sua patogénese, a compreensão dos complexos mecanismos moleculares de crescimento neoplásico mantém-se incompleta.<sup>1</sup> No processo da cancerigénese as células vão acumulando uma série de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem a modificações na actividade dos genes e a consequentes fenótipos alterados que são alvo de selecção.<sup>2</sup> O controlo da multiplicação celular é um dos passos essenciais na cancerigénese e é feito por uma série de mecanismos moleculares que controlam a proliferação celular e simultaneamente a morte celular. Qualquer factor que altere este balanço entre o crescimento e morte celular tem potencial para alterar o número total de células num órgão ou tecido. Depois de muitos ciclos celulares, este aumento da multiplicidade celular detectável a nível clínico, denomina-se neoplasia.<sup>3</sup>

A grande maioria das mutações que provocam cancro não são herdadas de pais para filhos, mas aparecem espontaneamente como uma consequência de erros na replicação ou danos no DNA, como por exemplo aductos e quebras nas cadeias de DNA. Estas alterações, após vários ciclos de replicação do DNA e subsequente divisão celular, resultam numa alteração funcional de genes essenciais. Assim, as células vão acumulando múltiplas mutações, culminando na sua transformação em células cancerígenas.<sup>3</sup> Hanahan *et al.* sugerem que os genótipos associados ao cancro são uma manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia, que colectivamente ditam o crescimento maligno: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a factores inibitórios de crescimento, evasão da morte celular programada, potencial replicativo sem limites, angiogénese sustentada, invasão de tecidos e metástase. Esta multiplicidade de mecanismos envolvidos na transformação celular pode explicar porque o cancro é mais comum em pessoas de idade avançada, já que permite o acumular de alterações genéticas ao longo do tempo.<sup>4</sup>

## Cancro da mama e os seus factores de risco

O cancro da mama é o segundo cancro mais comum em todo o mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano mais de 1.15 milhões de novos casos em todo o mundo são

diagnosticados, o que representa acima de 20% de todos os tipos de cancro diagnosticados nas mulheres.<sup>5</sup> O conhecimento crescente acerca da biologia do cancro da mama tem tido um grande impacto nos aspectos clínicos da doença, nomeadamente na detecção precoce de cancro da mama. O crescente conhecimento das vias de transformação envolvidas no cancro da mama pode também aumentar a capacidade para desenvolver a prevenção ou terapias mais adequadas a cada paciente.<sup>6</sup>

A etiologia do cancro da mama é extremamente complexa e o seu aparecimento e progressão é um processo de inúmeros passos resultantes de uma série de factores epigenéticos, genéticos, endócrinos e ambientais. Baseado em estudos epidemiológicos de diferentes populações estabeleceram-se prováveis factores de risco para o cancro da mama, conforme pode ser observado na **Tabela I**.<sup>7</sup>

**Tabela I** – Factores de risco para o cancro da mama (adaptado de Dumitrescu *et. al* 2005)

Factor de risco	Magnitude do risco
Idade avançada	++
Localização geográfica (países ocidentais)	++
História familiar de cancro da mama	++
Mutações em genes altamente penetrantes ( <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> )	++
Exposição à radiação ionizante na infância	++
Idade tardia da menopausa (>54anos)	++
Idade precoce da menarca (<12anos)	++
Nuliparidade e idade tardia do primeiro parto	++
Densidade mamográfica elevada	++
Terapia de substituição hormonal	+
Uso recente de contraceptivos orais	+
Consumo de álcool (≈ 1bebida/dia)	+
Amamentação de longa duração	--
Polimorfismos em genes de baixa penetrância	-
Consumo de frutas e vegetais	-

++ Aumento de risco moderado/alto

+ Aumento de risco moderado/baixo

-- Diminuição de risco moderado/alto

- Diminuição de risco moderado/baixo

O papel de factores genéticos na epidemiologia e patogénese de ambos os tipos de cancro da mama esporádico e familiar são agora bem conhecidos. Cerca de 10% de todos os casos de cancro da mama são hereditários, sendo que destes aproximadamente 80-90% estão relacionados com mutações nos genes dominantes com elevada penetrância, como *BRCA1* e *BRCA2*.<sup>8,9</sup> As alterações nestes genes supressores de tumores promovem a perda ou inactivação do alelo selvagem, resultando na expressão de uma proteína não funcional e perda do controlo do ciclo celular e dos mecanismos de reparação do DNA, permitindo o acumular de alterações genéticas que podem conduzir a instabilidade genómica.<sup>6</sup> Porém estes genes são

responsáveis por apenas uma pequena fracção ( $\approx 8\%$ ) do total dos tipos de cancro em desenvolvimento. Estas observações conduziram à hipótese de que a susceptibilidade para o cancro da mama é altamente poligénica, isto é, a susceptibilidade é conferida por um grande número de *loci*, cada um com um pequeno efeito no risco para o cancro da mama.<sup>10</sup> Assim, os polimorfismos em genes com baixa penetrância, associados à susceptibilidade para o cancro da mama, podem ter uma grande contribuição para a cancerigénese da mama, juntamente com a exposição a factores endógenos ou exógenos.<sup>11,12</sup>

### Polimorfismos e cancro da mama

As mutações são distintas dos polimorfismos por estarem associadas a uma patologia, enquanto os polimorfismos são variações genéticas que ocorrem naturalmente na população e podem estar associados à susceptibilidade para uma doença. As diferentes formas de polimorfismos (alelos) são observadas de modo mais frequente ( $>1\%$ ) na população do que as mutações ( $<1\%$ ).<sup>13</sup> Os polimorfismos mais comuns no genoma humano são os polimorfismos de um único nucleótido, SNPs. Para um SNP individual, um alelo é designado como o mais comum e outro como o menos comum, baseado na frequência observada na população geral.<sup>14</sup>

Apesar dos efeitos individuais dos SNPs serem de um modo geral pequenos, o efeito genético de combinações de SNPs funcionais relevantes podem aditivamente e de um modo sinérgico contribuir para o aumento do risco de cancro.<sup>2</sup> Assim, a grande abundância dos SNPs e o seu potencial para serem genotipados em grande escala, faz deles escolha como marcadores de DNA para os estudos de associação caso-controlo.<sup>15</sup> Deste modo as frequências genotípicas polimórficas são comparadas entre grupos com diferentes fenótipos. O objectivo é identificar quais os polimorfismos que possam estar relacionados com o risco de doença.<sup>10</sup> A maioria dos SNPs não ocorre nas regiões codificantes dos genes, não se traduzindo portanto numa alteração de aminoácido da proteína. Os poucos SNPs não sinónimos são alvo de investigação porque se presume que uma alteração num aminoácido pode levar à alteração quantitativa da função da proteína.<sup>14</sup> Através de estudos de associação efectuados, parece claro admitir que SNPs possam conferir algum aumento de risco significativo no desenvolvimento da doença. No entanto, não é ainda claro quando é que a análise de risco a um único polimorfismo se pode traduzir numa aproximação claramente preventiva ou terapêutica à doença.<sup>16</sup>

## Apoptose

A apoptose é um processo activo que conduz à morte celular, sendo concretizado por vias de sinalização programadas, cuja activação pode ser iniciada por uma série de estímulos intra ou extracelulares.<sup>17</sup> Os factores externos que medeiam a sensibilidade apoptótica são factores de crescimento, citocinas, interleucinas, glucocorticóides, androgéneos, estrogéneos e neurotransmissores. Existem também factores internos envolvidos nas vias apoptóticas, nomeadamente erros no DNA, desequilíbrios nas vias de sinalização, insuficiência dos factores de crescimento e hipoxia.<sup>18</sup> As alterações morfológicas características da apoptose são a constrição citoplasmática, o enrugamento membranar, a compactação da cromatina nuclear, a fragmentação do DNA cromossómico e a formação de pequenas vesículas apoptóticas.<sup>17</sup>

A apoptose desempenha um papel importante em inúmeros processos fisiológicos, nomeadamente nos processos de organização do sistema imunitário e do sistema nervoso central, modificações morfogenéticas durante o desenvolvimento embrionário, homeostasia dos tecidos e remoção de células danificadas. A apoptose inapropriada também é observada em doenças humanas. Como pode ser observado na **Tabela II**, as alterações nos genes apoptóticos, causadas por mutações ou pela modelação epigenética da expressão dos genes, foram identificadas como uma causa do aparecimento de algumas doenças.<sup>19</sup>

**Tabela II** – Alterações dos genes envolvidos na apoptose associados a doenças humanas (adaptado de Hajra *et. al* 2004; Müllauer *et. al* 2001 & Philchenkov *et. al* 2004)

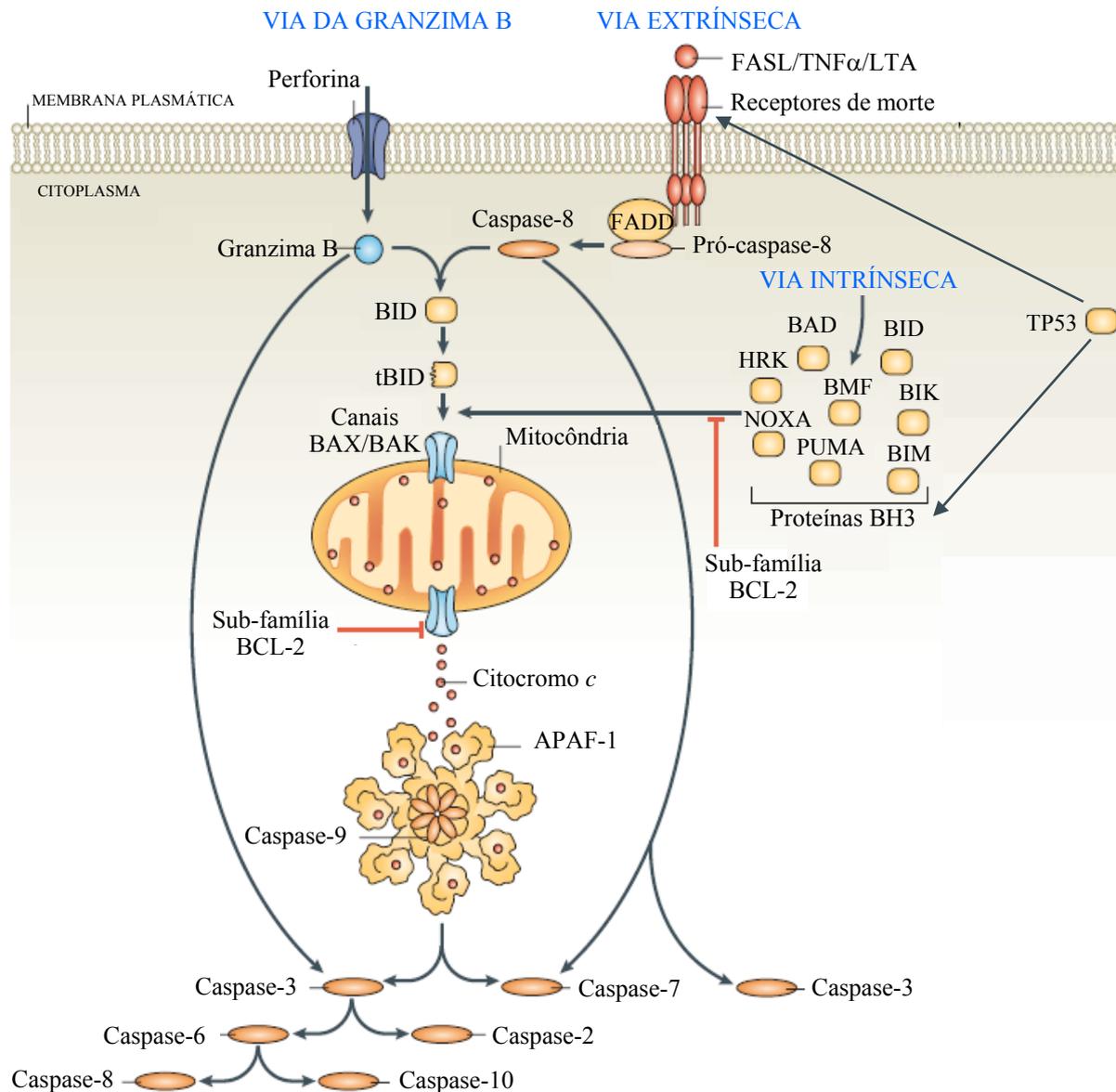
Alteração na proteína/gene	Doença associada
Sobre-expressão BCL-2	Linfoma folicular
Sobre-expressão BCL-x <sub>L</sub>	Cancro da mama, do pâncreas, do ovário, colo-rectal e das células escamosas do esófago
Sub-expressão APAF-1	Cancro do ovário, melanoma e leucemia
Sub-expressão CASP3	Cancro da mama, da próstata, do colo do útero e de células renais
Sub-expressão CASP6	Cancro do colo do útero
Sub-expressão CASP7	Cancro do cólon
Sub-expressão CASP8	Neuroblastomas, cancro de células renais, do pulmão de células pequenas e linfoma familiar
Sub-expressão CASP9	Cancro do cólon
Sub-expressão CASP10	Cancro do colo do útero, gástrico e das células renais
Mutações perda de função BAX/BAK	Cancro do cólon
Mutações no TNF-R1	Síndrome de febre periódica familiar
Mutações na perforina	Linfocitose hemofagocítica familiar (FHL)
Mutações na CASP10	Síndrome autoimune linfoproliferativo tipo II (ALPS II)
Mutações no TP53	Inúmeras neoplasias malignas
Mutações no BCL-2	Linfoma Não-Hodgkin

Especificamente no cancro, o balanço entre a proliferação e a morte celular programada está alterado, permitindo essas alterações nas vias de sinalização apoptótica a sobrevivência de células com lesões no DNA. Assim, o crescimento celular é o resultado não só da proliferação descontrolada, mas também da morte celular reduzida. As proteínas que sinalizam os erros celulares ou os sinais de crescimento aberrantes arrastam o ciclo celular para que esses erros possam ser reparados, ou se possível, para que a apoptose seja induzida. O mau funcionamento neste sistema conduz ao aparecimento de cancro, permitindo às células proliferar quando deviam ser reparadas ou morrer.<sup>20,21</sup> Por isso a identificação das alterações dos genes da apoptose envolvidos neste processo pode contribuir para a compreensão da significância fisiológica das moléculas envolvidas, pode ser útil como marcadores de diagnóstico da doença e pode ainda oferecer a possibilidade de se delinear terapias baseadas na natureza molecular da alteração apoptótica. À medida que as vias bioquímicas da apoptose vão sendo mais bem conhecidas surgem novas aplicabilidades e estratégias terapêuticas.<sup>22</sup> Por isso, o futuro próximo na terapia do cancro deve basear-se na aplicação combinada de estratégias sensíveis à apoptose, com a convencional radioterapia e quimioterapia.<sup>21</sup> Assim, o estudo da apoptose revela-se importante, não apenas para compreender os mecanismos reguladores dos processos fisiológicos normais, mas também para definir quais os mecanismos patofisiológicos envolvidos nas doenças humanas.<sup>19</sup>

Os principais componentes deste sistema proteolítico a que chamamos apoptose denominam-se caspases. As caspases, também conhecidas como proteases de cisteína específicas do aspartato, são uma família de proteínas intracelulares envolvidas na iniciação e execução da apoptose.<sup>23</sup> São proteínas produzidas na forma de pró-enzimas (zimogénios), podendo ser activadas pela clivagem proteolítica, em resposta a diversos estímulos apoptóticos. Cada caspase é clivada de modo a produzir uma sub-unidade grande e uma pequena, formando uma forma tetramérica activa a partir de duas moléculas da pró-enzima.<sup>19</sup> As caspases podem ter diversas isoformas resultantes do *splicing* alternativo ou de modificações pós-traducionais. No entanto, o significado biológico destas variantes está ainda por explicar.<sup>24</sup>

As caspases podem ser divididas em dois grupos: iniciadoras e efectoras. As iniciadoras (caspase 2, 8, 9 e 10) activam as efectoras (caspase 3, 6 e 7), sendo estas capazes de degradar directamente múltiplos substratos, levando à desregulação dos processos celulares vitais e à morte celular.<sup>21,25</sup> Todos os estímulos que levam à apoptose parecem iniciar os eventos que culminam na activação das caspases, mas fazem-no de modo diferente. Até agora foram identificadas 3 vias associadas à activação das caspases (ver **Figura 1**): a via intrínseca que é

iniciada por sinais de stress celular como os erros no DNA; a via extrínseca que é iniciada pela activação de receptores membranares de morte induzidos por ligandos e uma terceira via que envolve a granzima B.<sup>26-28</sup>



**Figura 1** – Vias de activação da apoptose: intrínseca, extrínseca e da granzima B (adaptado de Taylor *et al.* 2008)

Os sinais pró-apoptóticos transmitidos via intrínseca convergem para a mitocôndria, resultando numa permeabilização da membrana externa e subsequente libertação do citocromo *c* (um componente da cadeia de transporte de electrões).<sup>29</sup> Na maior parte das células, o citocromo *c* é altamente pró-apoptótico, estimulando a activação das caspases pela formação de um complexo com a proteína APAF-1 e a caspase iniciadora pró-caspase-9. Esta estrutura, denominada apoptossoma, activa a caspase-9, propagando esta o sinal de morte às

caspases efectoras. A regulação desta via é efectuada pelos membros da família BCL-2 que controlam a permeabilidade da membrana externa mitocondrial: BCL-2 e BCL-x<sub>L</sub> são inibidores da apoptose, enquanto BAX, BAK e homólogos de BCL-2 como as proteínas BH3 BID, BAD e BIM são moléculas pró-apoptóticas.<sup>23,30</sup>

A via extrínseca envolve a ligação de ligandos de morte extracelulares (ex. FASL) a receptores de morte da superfície celular pertencentes à família dos factores de necrose tumoral (ex. FAS). Após esta ligação ocorre uma mudança conformacional do receptor e são recrutadas as proteínas adaptadoras citoplasmáticas (ex. FADD), formando-se então o complexo de sinalização intracelular indutor de morte (DISC). Este complexo recruta a pró-caspase-8, promovendo a sua activação, podendo posteriormente o sinal de morte ser propagado de dois modos: activação directa das caspases efectoras ou a proteólise de BID, que sendo uma molécula pró-apoptótica vai promover a libertação do citocromo *c* e a reunião do apoptossoma.<sup>31</sup>

A via dependente da granzima B envolve a libertação desta protease na célula-alvo por grânulos especializados libertados pelos linfócitos T citotóxicos (CTL) ou pelas células *natural killer* (NK). Estas células também libertam perforina que se oligomeriza na membrana das células e permite a entrada da granzima B, que ao clivar tal como as caspases, substratos depois dos resíduos de Asp, activa as caspases efectoras.<sup>32</sup>

Parece existir ainda uma quarta via de indução da apoptose envolvendo a proteína nuclear TP53, que é activada em resposta a lesões no DNA. Se ocorrerem demasiadas lesões no DNA, e dependendo do tipo de célula, TP53 inicia a apoptose por mecanismos que envolvem a transcrição de genes executores da apoptose, como *BAX*, e genes cujos produtos produzem espécies reactivas de oxigénio.<sup>33,34</sup>

## Objectivos do trabalho

Como o cancro da mama é um dos cancros com maior incidência na população mundial feminina, tornou-se um dos cancros com maior interesse a nível científico.<sup>5</sup> No cancro o balanço entre a proliferação e a morte celular está alterado e os defeitos nas vias apoptóticas permitem às células com alterações genéticas sobreviverem.<sup>3</sup> Assim, qualquer mau funcionamento neste sistema pode levar ao desenvolvimento de cancro, permitindo às células proliferarem em vez de serem reparadas.<sup>20</sup> Por isso, este estudo visa uma abordagem global dos genes de todas as vias apoptóticas, tendo em vista identificar possíveis polimorfismos ou associações de polimorfismos que possam estar envolvidos na susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama na população portuguesa.

Foi demonstrado que os polimorfismos em genes de vias envolvidas na cancerigénese podem ser candidatos à associação com a susceptibilidade individual para cancro da mama, o que torna os polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) fortes candidatos a explicar o risco para a doença.<sup>11,12</sup> Como os estudos de associação genética, nomeadamente os estudos caso-controlo, são uma ferramenta importante para identificar estes alelos, permitindo verificar as diferenças nas frequências genóticas entre casos (portadores da doença) e controlos (não portadores da doença), foi efectuado um estudo caso-controlo em meio hospitalar, recolhendo uma amostra que se pretende significativa da população caucasiana portuguesa.<sup>35</sup> Esta foi genotipada, usando a técnica de PCR em tempo real e os resultados foram posteriormente analisados estatisticamente, de modo a verificar as possíveis diferenças significativas entre casos e controlos e concluir acerca da sua contribuição para a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama.

## Materiais e métodos

### Amostragem da população de estudo

Este estudo inclui 286 pacientes caucasianos do sexo feminino com cancro da mama (casos), recrutados no Departamento de Medicina Laboratorial do Hospital São Francisco Xavier, entre 2001 e 2006. Estes doentes não possuem história de outras doenças neoplásicas, patologias da tiróide ou sofreram transfusões de sangue nos últimos 12 meses, para evitar que se amplifique o DNA do dador de sangue em simultâneo com o do indivíduo seleccionado para o estudo. O diagnóstico histológico foi confirmado em todos os casos, incluindo 252 carcinomas ductais (88.1%), 14 carcinomas lobulares (4.9%) e 20 casos de outros carcinomas da mama (7.0%) como, por exemplo, medulares, mucinosos, metaplásicos e multifocais. Os controlos são constituídos por 546 indivíduos do sexo feminino, emparelhados com os doentes a nível da idade e estilo de vida, não tiveram qualquer doença maligna até à data e foram recrutados no mesmo Hospital. O anonimato dos casos e controlos foi garantido, e todos os estudos foram conduzidos com o consentimento escrito e informado de todos os indivíduos envolvidos, obtido antes da recolha de sangue, e respeitando a Declaração de Helsínquia. Para isso foi usado um inquérito epidemiológico administrado por entrevistadores experientes (ver **Anexos**), sendo recolhidas informações sobre características demográfico-sociais, história familiar de cancro, estilo de vida (hábitos tabágicos e alcoólicos), número de gestações e filhos, tempo de amamentação, idade da menarca e menopausa. O estilo de vida no que se refere a hábitos tabágicos e alcoólicos revela-se essencial para que se possa posteriormente estratificar os resultados, eliminando assim possíveis variáveis confundentes.

### Extracção de DNA

As amostras de sangue de todos os casos e controlos foram colhidas em tubos de 10mL com heparina e guardados a -80°C. O DNA genómico foi obtido a partir de 250µL de sangue, usando o kit comercial da Quiagen® (QIAmp® DNA Extraction kit; Quiagen®, Hilden, Alemanha). Cada amostra de DNA foi guardada a -20°C até ser analisada.

### Escolha dos polimorfismos

Os SNPs escolhidos para este estudo pertencem a genes de qualquer uma das vias de apoptose e tiveram que obedecer a alguns pré-requisitos: localizam-se nas regiões codificantes dos

genes em estudo, correspondem a uma substituição de aminoácido não-sinónima e a frequência alélica mínima verificada em estudos prévios na população caucasiana é superior a 5%, isto para que, com o tamanho da amostra que dispomos, se possam encontrar suficientes indivíduos com o genótipo variante e prevenir assim possíveis erros estatísticos. Para que todos os polimorfismos obedecessem a estas condições foi efectuada uma pesquisa exaustiva nas bases de dados existentes, nomeadamente no GeneCards (<http://www.genecards.org/index.shtml>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), SNPper (<http://snpper.chip.org/>) e SNP500 ([http://snp500cancer.nci.nih.gov/home\\_1.cfm](http://snp500cancer.nci.nih.gov/home_1.cfm)).

Com base nestes critérios foram identificados treze SNPs, constando da **Tabela III** a sua identificação, alteração de nucleótido e do correspondente aminoácido e a frequência alélica mínima (MAF).

**Tabela III** – Identificação dos polimorfismos em estudo: nome e localização do gene, identificação do SNP, sequência-alvo, alteração do nucleótido e consequente alteração do aminoácido e frequência alélica mínima (MAF)

Genes	SNP ID	Sequência-alvo [alteração nucleótido]	Alteração aminoácido	MAF
<i>LTA</i> Cromossoma 6	rs2229094	TGAACGTCTCTTCTCCCAAGGGTG[T/C]GTGGCACCACCCTACACCTCCTCCT	Cys13Arg	C:0.24
	rs1041981	CCCAAGATGCATCTTGCCCACAGCA[C/A]CCTCAAACCTGCTGCTCACCTCATT	Thr60Asn	A:0.36
<i>TNFRSF1B</i> Cromossoma 1	rs1061622	GTGGCCATCCCTGGGAATGCAAGCA[T/G]GGATGCAGTCTGCACGTCCACGTCC	Met196Arg	G:0.25
<i>CASP7</i> Cromossoma 10	rs2227309	ACGGAAAAGACCTGGAAATCATGCA[G/A]ATCCTCACCAGGGTGAATGACAGAG	Arg249Lys <sup>a</sup> Gln260Gln <sup>b</sup> Gln293Gln <sup>c</sup>	A:0.28
	rs2227310	CCATCCTGGAGGAGCACGGAAAAGA[C/G]CTGGAAATCATGCAGATCCTCACCA	Asp255Glu <sup>b</sup> Asp288Glu <sup>c</sup> Thr244Ser <sup>a</sup>	G:0.29
<i>CASP8</i> Cromossoma 2	rs1045485	AGCTTCATTTTGAGATCAAGCCCCAC[G/C]ATGACTGCACAGTAGAGCAAATCTA	Asp270His <sup>d</sup> Asp285His <sup>e</sup> Asp302His <sup>f</sup>	C:0.13
	rs1035142	TCCCAAATATAGTAAAAGTTCAATA[G/T]GAAGAAGGCCTTCAAATCAGTTTCT	Tyr12STOP <sub>d,e,f</sub>	T:0.49
<i>CASP9</i> Cromossoma 1	rs1052576	GGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGC[A/G]GCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGC	Arg221Gln <sup>g</sup>	G:0.48
	rs2308950	AGTGCGGGTGC GGAGCCCGGACTCA[G/A]GGCAGAAGTTCACATTGTTGATAAT	Arg173His <sup>g</sup>	A:0.07
	rs1820204	TCTCTTGCTACTTACCGACATCACC[T/G/C/A]AATCCTCCAGAACCAATGTCCACTG	Phe136Leu <sup>g,h</sup> Phe136Phe <sup>g,h</sup>	G:0.48
	rs1052571	CCTGAACAGCTCGCGGCTCAGCAGG[C/T]CGTCCCAGAGCTGGTCCACCTGCAG	Ala28Val <sup>g,h</sup>	T:0.48
<i>CASP10</i> Cromossoma 2	rs13006529	CCCTGTGCCCTGGATGCACTTTCA[A/T]TATAGCAGAGAGTTTTTGTGGTTC	Ile479Leu <sup>i</sup> Ile522Leu <sup>j</sup>	A:0.44
<i>TP53</i> Cromossoma 17	rs1042522	AGGAGCTGCTGGTGCAGGGGCCACG[G/C]GGGGAGCAGCCTCTGGCATTCTGGG	Arg72Pro	C:0.23

<sup>a</sup> Caspase-7 isoforma β; <sup>b</sup> Caspase-7 isoforma α; <sup>c</sup> Caspase-7 isoforma δ; <sup>d</sup> Caspase-8 isoforma C; <sup>e</sup> Precursor da caspase-8 isoforma B; <sup>f</sup> Caspase-8 isoforma A; <sup>g</sup> Pró-caspase-9 isoforma α; <sup>h</sup> Pró-caspase-9 isoforma β; <sup>i</sup> Pró-caspase-10 isoforma A; <sup>j</sup> pró-caspase-10 isoforma D

## Genotipagem dos polimorfismos

Para a genotipagem dos SNPs seleccionados usou-se a técnica *Taqman*<sup>®</sup> *SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems<sup>®</sup>; New Jersey, USA), utilizando-se placas ópticas de 96 poços. Por cada placa de reacção foram utilizados 4 controlos negativos (NTC, *No Template Control*) e os ciclos de PCR efectuados foram os comuns para a amplificação de DNA (10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 92°C e 1 minuto a 60°C). Aproximadamente 10% das amostras de DNA foram seleccionadas ao acaso para a confirmação do genótipo.

## Análise estatística

As frequências de Hardy-Weinberg para cada um dos polimorfismos tanto nos casos como nos controlos foram analisadas usando testes exactos de probabilidade, pelo software Mendel versão 8.0.1. e, de acordo com a literatura, usou-se o método False Discovery Rate para a detecção da ocorrência de possíveis falsos positivos.<sup>36,37</sup>

Para a análise de *linkage*, foi calculado o grau de desequilíbrio de *linkage* ( $D'$ ) e o respectivo *p-value*, usando o software SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats>).<sup>38</sup>

Foi usado o teste do  $\chi^2$  com um nível de significância de 0.05 para determinar as diferenças nas distribuições das frequências genótípicas (de cada SNP isoladamente ou de associações do tipo ligando-receptor), e também das classes de idades, hábitos tabágicos e alcoólicos, entre casos e controlos. Foram também calculados *odds ratio* (OR) crude e ajustados, correspondentes a um intervalo de confiança de 95%, usando a regressão logística. O genótipo mais frequente de cada SNP ou a combinação dos alelos mais comuns nas associações foram usados como grupo de referência nos modelos de regressão logística. O modelo de OR ajustado incluiu as idades de diagnóstico ( $\leq 30$ , 31-49, 50-69,  $\geq 70$  anos), tendo como referência a classe de idades mais baixa; os hábitos tabágicos (não fumador ou fumador), sendo os não fumadores o grupo de referência; os hábitos alcoólicos (nunca, social ou regular), usando os não consumidores como referência. Todas as análises foram efectuadas, usando o programa estatístico SPSS versão 16.0 (SPSS<sup>®</sup> Inc; Chicago, USA).

## Resultados

### Caracterização da amostra

Para os casos e controlos usados neste estudo foi utilizado o teste do  $\chi^2$ , de modo a determinar se as diferenças registadas entre eles eram estatisticamente significativas para as características principais da amostra – **Tabela IV**. Como se pode verificar não existem diferenças estatisticamente significativas entre casos e controlos, no que se refere à classe de idades e aos hábitos tabágicos. Já relativamente aos hábitos alcoólicos verifica-se que os consumidores de álcool são mais prevalentes nos casos do que nos controlos. Em estudos prévios foi relatada uma associação positiva entre a ingestão de álcool e o desenvolvimento de cancro da mama, já que o álcool pode actuar indirectamente através do seu metabolito primário, acetaldéido, um cancerígeno muito bem caracterizado.<sup>39</sup>

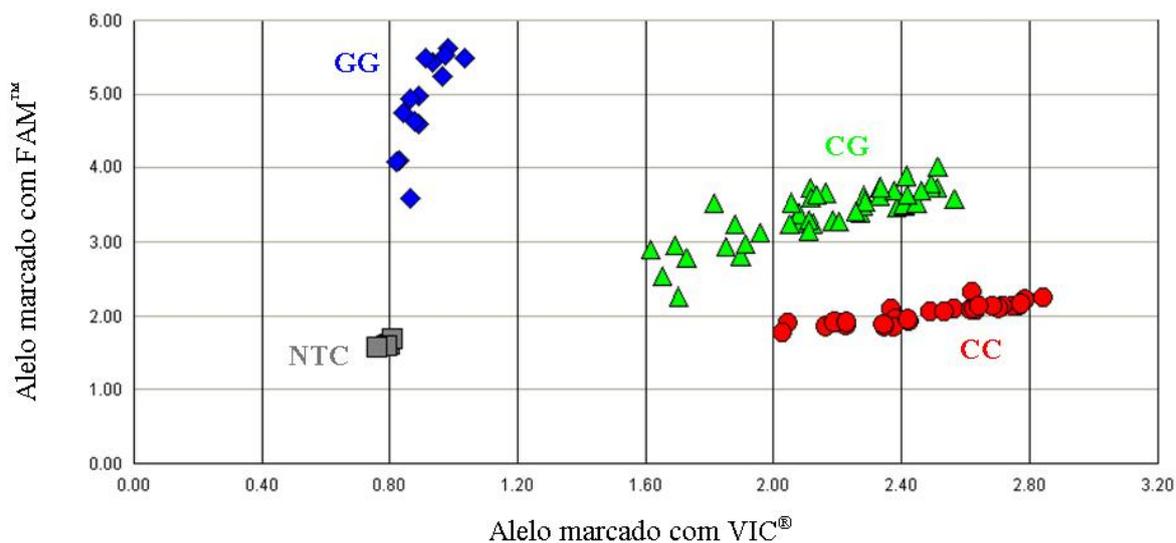
**Tabela IV** – Distribuição das características da amostra

Características	Classes	Casos n (%)	Controlos n (%)	p
Idade	≤ 30	1 (0.3%)	1 (0.2%)	0.937 <sup>a</sup>
	31-49	65 (22.7%)	119 (21.8%)	
	50-69	158 (55.2%)	301 (55.1%)	
	≥70	62 (21.7%)	125 (22.9%)	
Hábitos tabágicos	Não fumador	250 (88.0%)	490 (91.8%)	0.084 <sup>a</sup>
	Fumador	34 (12.0%)	44 (8.2%)	
	<i>Missings</i>	2	12	
Hábitos alcoólicos	Nunca	217 (76.7%)	441 (82.6%)	<0.001 <sup>a</sup>
	Social	25 (8.8%)	59 (11.0%)	
	Regular	42 (14.8%)	34 (6.4%)	
	<i>Missings</i>	2	12	

<sup>a</sup> casos vs controlos

### Genotipagem dos polimorfismos

Após a amplificação do DNA, dos indivíduos que compõem a amostra, para os diferentes SNPs escolhidos foi efectuada a discriminação alélica, com base na fluorescência emitida por cada uma das amostras. Assim, para cada SNP foi obtido um perfil de amplificação, tanto para casos como para controlos. Na **Figura 2** mostra-se um exemplo de um perfil obtido, neste caso pertencente ao polimorfismo *CASP7 Asp255Glu*.



**Figura 2** – Perfil da genotipagem do gene *CASP7* Asp255Glu, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Os homozigóticos marcados com VIC® correspondem ao genótipo CC, os homozigóticos marcados com FAM™ correspondem ao genótipo GG e os heterozigóticos CG foram marcados com ambos os fluoróforos VIC® e FAM™.

#### Análise estatística das frequências alélicas e genóticas dos diferentes polimorfismos

Usando o teste de probabilidade exacta do software Mendel versão 8.0.1, foi analisado se os diferentes polimorfismos estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg em ambas as populações de casos e controlos, a frequência alélica mínima e o respectivo desvio-padrão. A análise permite dizer que para todos os polimorfismos as frequências genóticas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, excepto para os polimorfismos *TNFRSF1B* Met196Arg ( $p=0.026$  para os controlos) e *CASP10* Ile522Leu ( $p=0.017$  para os casos). Aplicando o método False Discovery Rate a estes resultados é possível afirmar que se espera que nenhum dos valores que considerámos significativos represente um falso positivo.

Para cada polimorfismo seleccionado foi efectuado o teste do  $\chi^2$  para avaliar se existiam diferenças estatisticamente significativas das frequências genóticas entre casos e controlos. Apenas para o SNP *CASP10* Ile522Leu se pode dizer que existe uma diferença estatisticamente significativa, mas com pouca relevância ( $p=0.045$ ) das frequências genóticas entre casos e controlos, ou seja existe evidência de uma possível associação deste SNP com a susceptibilidade individual para cancro da mama.

Todos os dados referentes a estas análises encontram-se sumarizados na **Tabela V**.

**Tabela V** – Distribuição das frequências genotípicas, da frequência alélica mínima (MAF) e dos *p-values* de HW dos casos e controles, para cada polimorfismo

<i>LTA Cys13Arg (T/C)</i>					
	Cys/Cys*	Cys/Arg*	Arg/Arg*	MAF	p HW
Controlos	272 (49.8%)	213 (39.0%)	61 (11.2%)	C: 0.3068(±0.0140)	0.055
Casos	128 (44.9%)	130 (45.6%)	27 (9.5%)	C: 0.3240(±0.0195)	0.564
<i>LTA Thr60Asn (C/A)</i>					
	Thr/Thr*	Thr/Asn*	Asn/Asn*	MAF	p HW
Controlos	263 (48.7%)	218 (40.4%)	59 (10.9%)	A: 0.3111(±0.0141)	0.179
Casos	150 (53.0%)	112 (39.6%)	21 (7.4%)	A: 0.2719(±0.0186)	0.982
<i>TNFRSF1B Met196Arg (T/G)</i>					
	Met/Met*	Met/Arg*	Arg/Arg*	MAF	p HW
Controlos	336 (62.1%)	169 (31.2%)	36 (6.7%)	G: 0.2227(±0.0127)	<b>0.026</b>
Casos	170 (60.1%)	100 (35.3%)	13 (4.6%)	G: 0.2228(±0.0174)	0.692
<i>CASP7 Arg249Lys (G/A)</i>					
	Arg/Arg*	Lys/Arg*	Lys/Lys*	MAF	p HW
Controlos	297 (55.2%)	213 (39.6%)	28 (5.2%)	A: 0.2500(±0.0132)	0.190
Casos	169 (60.1%)	103 (36.7%)	9 (3.2%)	A: 0.2138(±0.0172)	0.151
<i>CASP7 Asp255Glu (C/G)</i>					
	Asp/Asp*	Asp/Glu*	Glu/Glu*	MAF	p HW
Controlos	299 (55.7%)	209 (38.9%)	29 (5.4%)	G: 0.2486(±0.0132)	0.328
Casos	169 (60.4%)	102 (36.4%)	9 (3.2%)	G: 0.2128(±0.0172)	0.167
<i>CASP8 Asp302His (G/C)</i>					
	Asp/Asp*	Asp/His*	His/His*	MAF	p HW
Controlos	420 (77.3%)	115 (21.2%)	8 (1.5%)	C: 0.1206(±0.0099)	0.968
Casos	211 (74.6%)	67 (23.7%)	5 (1.8%)	C: 0.1386(±0.0145)	0.812
<i>CASP8 Tyr12STOP (G/T)</i>					
	Tyr/Tyr*	Tyr/STOP*	STOP/STOP*	MAF	p HW
Controlos	182 (33.6%)	271 (50.1%)	88 (16.3%)	T: 0.4131 (±0.0150)	0.442
Casos	91 (32.2%)	138 (48.8%)	54 (19.1%)	T: 0.4316 (±0.0207)	0.825
<i>CASP9 Arg221Gln (A/G)</i>					
	Arg/Arg*	Arg/Gln*	Gln/Gln*	MAF	p HW
Controlos	161 (29.7%)	271 (49.9%)	111(20.4%)	G: 0.4540(±0.0151)	0.876
Casos	89 (31.4%)	132 (46.6%)	62 (21.9%)	G: 0.4509(±0.0208)	0.331
<i>CASP9 Arg173His (G/A)</i>					
	Arg/Arg*	Arg/His*	His/His*	MAF	p HW
Controlos	538 (98.7%)	7 (1.3%)	0 (0%)	A: 0.0064(±0.0024)	0.832
Casos	282 (99.3%)	2 (0.7%)	0 (0%)	A: 0.0035(±0.0025)	0.933
<i>CASP9 Phe136Leu (T/G/C/A)</i>					
	Phe/Phe*	Phe/Leu*	Leu/Leu*	MAF	p HW
Controlos	166 (30.4%)	270 (49.5%)	110(20.1%)	G: 0.4487(±0.0151)	0.991
Casos	89 (31.3%)	133 (46.8%)	62 (21.8%)	G: 0.4510(±0.0208)	0.362
<i>CASP9 Ala28Val (C/T)</i>					
	Ala/Ala*	Ala/Val*	Val/Val*	MAF	p HW
Controlos	162 (29.8%)	269 (49.5%)	112(20.6%)	T: 0.4540 (±0.0151)	0.986
Casos	88 (31.3%)	131 (46.6%)	62 (22.1%)	T: 0.4523 (±0.0209)	0.325

**Tabela V (continuação)** – Distribuição das frequências genotípicas, da frequência alélica mínima (MAF) e dos *p-values* de HW dos casos e controlos, para cada polimorfismo

<i>CASP10</i> Ile522Leu (A/T)					
	Ile/Ile*	Ile/Leu*	Leu/Leu*	MAF	p HW
Controlos	159 (29.7%)	261 (48.7%)	116(21.6%)	A: 0.4599(±0.0152)	0.646
Casos	62 (22.1%)	159 (56.8%)	59 (21.1%)	A: 0.4947(±0.0211)	<b>0.017</b>
<i>TP53</i> Arg72Pro (G/C)					
	Arg/Arg*	Arg/Pro*	Pro/Pro*	MAF	p HW
Controlos	292 (53.7%)	217 (39.9%)	35 (6.4%)	C: 0.2638 (±0.0134)	0.526
Casos	154 (54.2%)	112 (39.4%)	18 (6.3%)	C: 0.2605 (±0.0184)	0.664

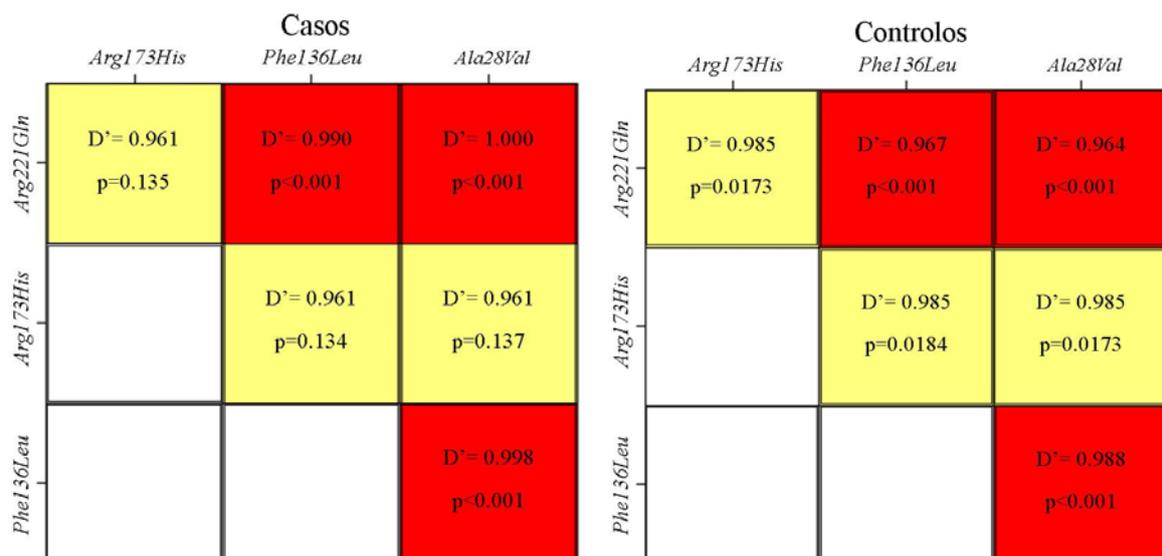
\* Número de indivíduos para cada genótipo *n* e respectiva frequência genotípica (%)

### Análise estatística do grau de *linkage* entre os diferentes polimorfismos

Relativamente às análises de desequilíbrio de *linkage*, verificou-se que existem alguns polimorfismos que estão em perfeito desequilíbrio de *linkage* ( $p < 0.001$ ), tanto para os casos como para os controlos, como se pode verificar na **Tabela VI**. Para os polimorfismos da *CASP9*, os dados encontram-se sumarizados na **Figura 3**, podendo afirmar-se que apenas os polimorfismos Arg221Gln/Phe136Leu; Arg221Gln/Ala28Val e Phe136Leu/Ala28Val da *CASP9* se encontram em desequilíbrio de *linkage* entre si, tanto os casos como os controlos.

**Tabela VI** – Grau de desequilíbrio de *linkage* ( $D'$ ) entre os diferentes polimorfismos

Polimorfismos	Casos	Controlos
<i>CASP7</i> Arg249Lys/Asp255Glu	$D'=0.9875$	$D'=0.9817$
<i>CASP8</i> Asp302His/Tyr12STOP	$D'=0.9990$	$D'=0.9632$
<i>CASP8</i> Asp302His/ <i>CASP10</i> Ile522Leu	$D'=0.5103$	$D'=0.6462$
<i>CASP8</i> Tyr12STOP/ <i>CASP10</i> Ile522Leu	$D'=0.3038$	$D'=0.3602$
<i>LTA</i> Cys13Arg/Thr60Asn	$D'=0.9991$	$D'=0.9262$



**Figura 3** – Grau de desequilíbrio de *linkage* entre os diferentes polimorfismos da *CASP9* e respectivos *p-values* para casos (esquerda) e controlos (direita)

## Análise estatística da associação dos diferentes polimorfismos com o cancro da mama

Através da regressão logística, foram calculados *odds ratio* (OR) crude e ajustados com um intervalo de confiança de 95%, para a associação de cada polimorfismo com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama. Apenas para o SNP *CASP10* Ile522Leu se verificou uma associação estatisticamente significativa: os indivíduos com o genótipo Ile/Leu apresentam uma susceptibilidade acrescida para esta patologia (OR=1.562; IC= 1.097-2.225; p=0.013), mantendo-se estes valores aproximados, mesmo depois de ajustado para as variáveis confundentes (OR<sub>ajustado</sub>=1.527; IC=1.065-2.188; p=0.021) - **Tabela VII**.

Para o número de alelos variantes de cada polimorfismo foi efectuado o teste do  $\chi^2$ , tendo em vista avaliar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os casos e controlos, no que se refere à dosagem genotípica. Através da regressão logística, foram calculados *odds ratio* (OR) crude e ajustados com um intervalo de confiança de 95%, para a associação da presença de alelos variantes de cada polimorfismo com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama. Novamente, apenas para o SNP *CASP10* Ile522Leu se verificou uma associação estatisticamente significativa (OR=1.483; IC=1.058-2.078; p=0.022) entre a ocorrência de um ou mais alelos variantes deste SNP com a susceptibilidade individual para cancro da mama. No entanto, estes valores perdem significância (apesar de se aproximarem dela) após o ajustamento para as variáveis confundentes (OR<sub>ajustado</sub>=1.406; IC=0.998-1.982).

## Análise estatística das associações e interacções entre os diferentes polimorfismos

Foi efectuado o teste do  $\chi^2$  para as seguintes associações: *LTA* Cys13Arg/Thr60Asn; *CASP7* Arg249Lys/Asp255Glu; *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP e *CASP9* Arg221Gln/Arg173His/Phe136Leu/Ala28Val. Tendo em conta que os genes da *CASP8* e *CASP10* se situam no mesmo cromossoma (2q33-34) e apenas distam entre si 4000pb, é biologicamente plausível considerar também a associação *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP/*CASP10* Ile522Leu para análise estatística. Neste estudo do efeito genético de combinações de SNPs também foi considerada a interacção dos polimorfismos *LTA* Cys13Arg/Thr60Asn/*TNFRSF1B* Met196Arg, já que TNF e LTA se ligam ambos aos receptores TNF-R1 e TNF-R2, partilhando muitas actividades biológicas, nomeadamente a activação da via extrínseca da apoptose.<sup>40</sup>

**Tabela VII – Odds ratio e intervalos de confiança a 95% para cada polimorfismo e para o número de alelos variantes nos casos e controles**

<i>LTA Cys13Arg (T/C)</i>				
	Cys/Cys	Cys/Arg	Arg/Arg	Cys/Arg + Arg/Arg
OR crude (IC)	1 (referência)	1.297 (0.958-1.756)	0.941 (0.571-1.550)	1.218 (0.913-1.623)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	1.290 (0.937-1.757)	0.921 (0.554-1.532)	1.207 (0.900-1.618)
<i>LTA Thr60Asn (C/A)</i>				
	Thr/Thr	Thr/Asn	Asn/Asn	Thr/Asn + Asn/Asn
OR crude (IC)	1 (referência)	0.901 (0.665-1.220)	0.624 (0.365-1.068)	0.842 (0.631-1.123)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.910 (0.667-1.241)	0.587 (0.340-1.013)	0.838 (0.625-1.125)
<i>TNFRSF1B Met196Arg (T/G)</i>				
	Met/Met	Met/Arg	Arg/Arg	Met/Arg + Arg/Arg
OR crude (IC)	1 (referência)	1.170 (0.859-1.592)	0.714 (0.369-1.382)	1.089 (0.812-1.463)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	1.172 (0.855-1.606)	0.782 (0.400-1.525)	1.106 (0.818-1.494)
<i>CASP7 Arg249Lys (G/A)</i>				
	Arg/Arg	Lys/Arg	Lys/Lys	Lys/Arg + Lys/Lys
OR crude (IC)	1 (referência)	0.850 (0.629-1.149)	0.565 (0.260-1.225)	0.817 (0.609-1.095)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.853 (0.627-1.160)	0.598 (0.274-1.305)	0.824 (0.611-1.112)
<i>CASP7 Asp255Glu (C/G)</i>				
	Asp/Asp	Asp/Glu	Glu/Glu	Asp/Glu + Glu/Glu
OR crude (IC)	1 (referência)	0.863 (0.638-1.169)	0.549 (0.254-1.187)	0.825 (0.615-1.107)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.867 (0.637-1.180)	0.578 (0.265-1.257)	0.833 (0.617-1.123)
<i>CASP8 Asp302His (G/C)</i>				
	Asp/Asp	Asp/His	His/His	Asp/His + His/His
OR crude (IC)	1 (referência)	1.160 (0.822-1.635)	1.244 (0.402-3.849)	1.165 (0.834-1.628)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	1.090 (0.767-1.549)	1.255 (0.402-3.919)	1.101 (0.782-1.549)
<i>CASP8 Tyr12STOP (G/T)</i>				
	Tyr/Tyr	Tyr/STOP	STOP/STOP	Tyr/STOP + STOP/STOP
OR crude (IC)	1 (referência)	1.018 (0.736-1.409)	1.227 (0.805-1.872)	1.070 (0.787-1.453)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	1.053 (0.756-1.466)	1.299 (0.844-1.998)	1.112 (0.813-1.521)

**Tabela VII (continuação)** – Odds ratio e intervalos de confiança a 95% para cada polimorfismo e para o número de alelos variantes nos casos e controles

<i>CASP9 Arg221Gln (A/G)</i>				
	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Arg/Gln + Gln/Gln
OR crude (IC)	1 (referência)	0.881 (0.632-1.228)	1.010 (0.674-1.514)	0.919 (0.673-1.254)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.825 (0.587-1.161)	1.005 (0.665-1.520)	0.877 (0.638-1.206)
<i>CASP9 Arg173His (G/A)</i>				
	Arg/Arg	Arg/His	His/His	Arg/His + His/His
OR crude (IC)	1 (referência)	0.545 (0.112-2.641)	-	-
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.527 (0.107-2.602)	-	-
<i>CASP9 Phe136Leu (T/G/C/A)</i>				
	Phe/Phe	Phe/Leu	Leu/Leu	Phe/Leu + Leu/Leu
OR crude (IC)	1 (referência)	0.919 (0.660-1.279)	1.051 (0.702-1.575)	0.957 (0.702-1.305)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.861 (0.613-1.209)	1.039 (0.688-1.570)	0.912 (0.664-1.253)
<i>CASP9 Ala28Val (C/T)</i>				
	Ala/Ala	Ala/Val	Val/Val	Ala/Val + Val/Val
OR crude (IC)	1 (referência)	0.897 (0.643-1.251)	1.019 (0.680-1.527)	0.933 (0.683-1.274)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.828 (0.588-1.164)	1.013 (0.670-1.529)	0.881 (0.641-1.212)
<i>CASP10 Ile522Leu (A/T)</i>				
	Ile/Ile	Ile/Leu	Leu/Leu	Ile/Leu + Leu/Leu
OR crude (IC)	1 (referência)	<b>1.562 (1.097-2.225)*</b>	1.304 (0.849-2.004)	<b>1.483 (1.058-2.078)***</b>
OR ajustado (IC)	1 (referência)	<b>1.527 (1.065-2.188)**</b>	1.150 (0.741-1.783)	1.406 (0.998-1.982)
<i>TP53 Arg72Pro (G/C)</i>				
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Arg/Pro + Pro/Pro
OR crude (IC)	1 (referência)	0.979 (0.725-1.321)	0.975 (0.535-1.779)	0.978 (0.733-1.304)
OR ajustado (IC)	1 (referência)	0.954 (0.703-1.296)	0.941 (0.510-1.735)	0.952 (0.710-1.278)

\* p=0.013; \*\* p=0.021; \*\*\* p= 0.022

Como se pode verificar na **Tabela VIII**, para nenhum dos genótipos das associações se verificou associação com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama.

Para a associação *CASP9* Arg221Gln/Arg173His/Phe136Leu/Ala28Val foram observados 17 genótipos, mas para uma análise estatística mais rigorosa foram agrupados 14 genótipos com uma frequência menor que 4% e considerados os outros 3 genótipos com uma frequência conjunta superior a 95%. De modo análogo, para a associação dos genes *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP/*CASP10* Ile522Leu foram observados 18 genótipos, sendo posteriormente agrupados 7 genótipos com uma frequência menor que 4% e considerados os outros 11 genótipos com uma frequência conjunta superior a 90%. Também para a interacção *LTA* Cys13Arg/Thr60Asn/*TNFRSF1B* Met196Arg se verificou a existência de 20 genótipos, e após o agrupamento dos genótipos com uma frequência menor que 4%, restaram 10 genótipos com uma frequência conjunta superior a 85%. Na análise efectuada a estas associações/interacção também não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa com a susceptibilidade individual para cancro da mama.

O polimorfismo *CASP9* Phe136Leu apresenta alguns problemas no que respeita à troca de nucleótido, já que de acordo com o NCBI não existe ainda certeza de qual a troca de nucleótido neste local, o que também pode alterar a mudança de aminoácido correspondente. Assim não temos a certeza de qual o verdadeiro genótipo dos indivíduos, apesar da Taqman<sup>®</sup> nos garantir que os fluoróforos usados marcam a timina e a guanina, o que corresponde a uma transição do aminoácido fenilalanina-leucina.

Análise estatística da associação das associações e interacções dos polimorfismos com o cancro da mama

Através da regressão logística, foram calculados *odds ratio* (OR) crude e ajustados com um intervalo de confiança de 95%, para a associação das associações/interacção dos SNPs com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama. Para a associação *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP foi verificada uma associação estatisticamente significativa no genótipo GC/GG (OR=1.734; IC=1.020-2.947; p=0.042), mas que perdeu significância após o ajustamento com as variáveis confundentes. Também se verificou o mesmo para o genótipo GG/GG/AT da associação *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP/*CASP10* Ile522Leu.

**Tabela VIII – Distribuição das frequências genotípicas dos casos e controlos, para as diferentes associações e interações**

<i>LTA Cys13Arg (T/C) / Thr60Asn (C/A)</i>														
	TT/CC*	TT/CA*	TT/AA*	TC/CC*	TC/CA*	CC/AA*	CC/CA*							p
Controlos	86 (15.9%)	124 (23.0%)	59 (10.9%)	122 (22.6%)	89 (16.5%)	55 (10.2%)	5 (0.9%)							0.284
Casos	47 (16.6%)	59 (20.8%)	21 (7.4%)	76 (26.9%)	53 (18.7%)	27 (9.5%)	0 (0.0%)							
<i>CASP7 Arg249Lys (G/A) / Asp255Glu (C/G)</i>														
	GG/CC*	GG/CG*	GA/CC*		GA/CG*		AA/GG*						p	
Controlos	292 (54.6%)	3 (0.6%)	6 (1.1%)		206 (38.5%)		28 (5.2%)						0.536	
Casos	166 (59.5%)	1 (0.4%)	2 (0.7%)		101 (36.2%)		9 (3.2%)							
<i>CASP8 Asp302His (G/C) / Tyr12STOP (G/T)</i>														
	GG/GG*	GG/GT*	GG/TT*	GC/GG*	GC/GT*	GC/TT*	CC/GG*							p
Controlos	117 (21.7%)	213 (39.4%)	87 (16.1%)	56 (10.4%)	58 (10.7%)	1 (0.2%)	8 (1.5%)							0.426
Casos	47 (16.6%)	110 (38.9%)	54 (19.1%)	39 (13.8%)	28 (9.9%)	0 (0%)	5 (1.8%)							
<i>CASP9 Arg221Gln (A/G) / Arg173His (G/A) / Phe136Leu (T/G/C/A) / Ala28Val (C/T)</i>														
	AA/GG/ TT/CC*		AG/GG/ TG/CT*			GG/GG/ GG/TT*			Outros*					p
Controlos	150 (27.7%)		260 (48.0%)			106 (19.6%)			26 (4.8%)					0.330
Casos	88 (31.3%)		130 (46.3%)			58 (20.6%)			5 (1.8%)					
<i>CASP8 Asp302His (G/C) / Tyr12STOP (G/T) / CASP10 Ile522Leu (A/T)</i>														
	GG/GG/ AA*	GG/GG/ AT*	GG/GG/ TT*	GG/GT/ AA*	GG/GT/ AT*	GG/GT/ TT*	GG/TT/ AA*	GG/TT/ AT*	GC/GG/ AT*	GC/GG/ TT*	GC/GT/ AT*	Outros*	p	
Controlos	26 (4.9%)	56 (10.4%)	33 (6.2%)	76 (14.2%)	110 (20.5%)	26 (4.9%)	42 (7.8%)	30 (5.6%)	29 (5.4%)	24 (4.5%)	34 (6.3%)	50 (9.3%)	0.051	
Casos	5 (1.8%)	31 (11.1%)	11 (3.9%)	28 (10.0%)	57 (20.4%)	23 (8.2%)	21 (7.5%)	28 (10.0%)	22 (7.9%)	13 (4.6%)	19 (6.8%)	22 (7.9%)		
<i>LTA Cys13Arg (T/C) / Thr60Asn (C/A) / TNFRSF1B Met196Arg (T/G)</i>														
	TT/CC/ TT*	TT/CC/ TG*	TT/CA/ TT*	TT/CA/ TG*	TT/AA/ TT*	TC/CC/ TT*	TC/CC/ TG*	TC/CA/ TT*	TC/CA/ TG*	CC/CC/ TT*	Outros*	p		
Controlos	61 (11.3%)	19 (3.5%)	80 (14.9%)	37 (6.9%)	35 (6.5%)	68 (12.6%)	46 (8.6%)	49 (9.1%)	34 (6.3%)	37 (6.9%)	72 (13.4%)	0.500		
Casos	28 (9.9%)	15 (5.3%)	37 (13.1%)	20 (7.1%)	11 (3.9%)	45 (15.9%)	29 (10.2%)	34 (12.0%)	15 (5.3%)	15 (5.3%)	34 (12.0%)			

\* Número de indivíduos para cada genótipo *n* e respectiva frequência genotípica (%)

No entanto foram verificadas associações estatisticamente significativas para os genótipos GG/GT/TT ( $OR_{ajustado}=3.748$ ;  $IC=1.216-11.554$ ;  $p=0.021$ ); GG/TT/AT ( $OR_{ajustado}=4.399$ ;  $IC=1.454-13.312$ ;  $p=0.009$ ) e GC/GG/AT ( $OR_{ajustado}= 3.488$ ;  $IC=1.137-10.700$ ;  $p=0.029$ ) da associação *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP/*CASP10* Ile522Leu. Os dados encontram-se sumarizados na **Tabela IX**.

De modo análogo à secção anterior “Análise estatística da associação dos diferentes polimorfismos com o cancro da mama” foram efectuadas as mesmas análises estatísticas para o número de alelos variantes de cada associação, não se tendo verificado qualquer diferença estatisticamente significativa quer a nível das frequências do número de alelos variantes entre casos e controlos quer a nível da sua associação com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama. Deste modo não se torna relevante a apresentação da tabela com estes dados.

Tabela IX – Odds ratio e intervalos de confiança a 95% para as associações/interacções dos polimorfismos

<b>LTA Cys13Arg (T/C) / Thr60Asn (C/A)</b>												
	TT/CC	TT/CA	TT/AA	TC/CC	TC/CA	CC/AA	CC/CA					
OR crude	1 (referência)	0.871 (0.543-1.395)	0.651 (0.353-1.201)	1.140 (0.722-1.799)	1.090 (0.666-1.782)	0.898 (0.502-1.607)	-					
OR ajustado	1 (referência)	0.931 (0.575-1.507)	0.625 (0.335-1.165)	1.183 (0.743-1.884)	1.076 (0.649-1.784)	0.900 (0.497-1.630)	-					
<b>CASP7 Arg249Lys (G/A) / Asp255Glu (C/G)</b>												
	GG/CC	GG/CG	GA/CC	GA/CG	AA/GG							
OR crude	1 (referência)	0.586 (0.061-5.682)	0.586 (0.117-2.938)	0.862 (0.636-1.170)	0.565 (0.261-1.227)							
OR ajustado	1 (referência)	0.610 (0.062-5.986)	0.496 (0.094-2.603)	0.863 (0.633-1.177)	0.593 (0.271-1.296)							
<b>CASP8 Asp302His (G/C) / Tyr12STOP (G/T)</b>												
	GG/GG	GG/GT	GG/TT	GC/GG	GC/GT	GC/TT	CC/GG					
OR crude	1 (referência)	1.286 (0.854-1.936)	1.545 (0.957-2.496)	<b>1.734 (1.020-2.947)*</b>	1.202 (0.684-2.112)	-	1.556 (0.484-5.000)					
OR ajustado	1 (referência)	1.316 (0.868-1.996)	1.604 (0.983-2.616)	1.636 (0.952-2.812)	1.172 (0.659-2.083)	-	1.611 (0.495-5.237)					
<b>CASP9 Arg221Gln (A/G) / Arg173His (G/A) / Phe136Leu (T/G/C/A) / Ala28Val (C/T)</b>												
	AA/GG/ TT/CC	AG/GG/ TG/CT	GG/GG/ GG/TT	Outros								
OR crude	1 (referência)	0.852 (0.608-1.194)	0.933 (0.616-1.412)	n.a.								
OR ajustado	1 (referência)	0.787 (0.557-1.111)	0.912 (0.598-1.393)	n.a.								
<b>CASP8 Asp302His (G/C) / Tyr12STOP (G/T) / CASP10 Ile522Leu (A/T)</b>												
	GG/G G/AA	GG/GG/ AT	GG/GG/ TT	GG/GT/ AA	GG/GT/ AT	GG/GT/ TT	GG/TT/ AA	GG/TT/ AT	GC/GG/ AT	GC/GG/ TT	GC/GT/ AT	Outros
OR crude	1 (refer)	2.879 (1.004-8.250)	1.733 (0.535-5.615)	1.916 (0.670-5.478)	2.695 (0.982-7.392)	4.600 (1.517-13.950)	2.600 (0.873-7.741)	4.853 (1.637-14.390)	3.945 (1.305-11.922)	2.817 (0.873-9.086)	2.906 (0.958-8.814)	n.a.
OR ajust.	1 (refer)	2.472 (0.852-7.181)	1.332 (0.402-4.410)	1.725 (0.596-4.997)	2.379 (0.857-6.606)	3.748 ** (1.216-11.554)	2.368 (0.784-7.158)	4.399 *** (1.454-13.312)	3.488 **** (1.137-10.700)	2.168 (0.659-7.136)	2.612 (0.849-8.038)	n.a.
<b>LTA Cys13Arg (T/C) / Thr60Asn (C/A) / TNFRSF1B Met196Arg (T/G)</b>												
	TT/CC/TT	TT/CC/TG	TT/CA/TT	TT/CA/TG	TT/AA/TT	TC/CC/TT	TC/CC/TG	TC/CA/TT	TC/CA/TG	CC/CC/TT	Outros	
OR crude	1 (referência)	1.720 (0.764-3.872)	1.008 (0.557-1.824)	1.178 (0.582-2.382)	0.685 (0.304-1.542)	1.442 (0.803-2.587)	1.373 (0.721-2.618)	1.512 (0.809-2.826)	0.961 (0.452-2.044)	0.883 (0.418-1.867)	n.a.	
OR ajust.	1 (referência)	1.729 (0.756-3.954)	1.085 (0.591-1.991)	1.240 (0.605-2.543)	0.623 (0.272-1.430)	1.489 (0.819-2.708)	1.441 (0.745-2.785)	1.485 (0.781-2.822)	0.908 (0.416-1.984)	0.893 (0.416-1.919)	n.a.	

n.a. Não aplicável; \* p=0.042; \*\* p=0.021; \*\*\* p=0.009; \*\*\*\* p=0.029

## Discussão

A importância da apoptose como mecanismo responsável pela eliminação de células malignas tornou-se evidente ao longo da década passada, estando a sua desregulação implicada na patogénese de inúmeras doenças.<sup>21,22,41</sup> Assim, torna-se relevante estudar se existe alguma associação de polimorfismos nos genes destas vias com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama, que é a neoplasia alvo deste estudo.

Relativamente às frequências alélicas mínimas obtidas neste estudo, todas são semelhantes às frequências previamente descritas para a população caucasiana noutros estudos e às fornecidas pelo Hap-Map CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain).<sup>42-47</sup>

Os resultados deste estudo não permitiram identificar quaisquer associações com a susceptibilidade individual para cancro da mama nos seguintes polimorfismos: *LTA* Cys13Arg e Thr60Asn; *TNFRSF1B* Met196Arg; *CASP7* Arg249Lys e Asp255Glu; *CASP9* Arg221Gln, Arg173His, Phe136Leu e Ala28Val e *TP53* Arg72Pro.

Relativamente aos polimorfismos do gene *LTA* não se verificaram quaisquer associações com a susceptibilidade para cancro da mama neste estudo. No entanto, num estudo prévio na população americana, para o genótipo GG do polimorfismo *TNF* -417 G/A foi encontrada uma associação positiva (OR=1.18; IC=1.04-1.35), representando um aumento do risco para desenvolvimento de cancro da mama.<sup>48</sup> Também numa população indiana, o genótipo heterozigótico do polimorfismo *LTA* +252A/G representa um factor de aumento de risco para o cancro da mama (OR=2.38; IC=1.17-4.85; p=0.025), assim como para os indivíduos que possuem pelo menos um alelo variante do polimorfismo *TNF* -308G/A (OR=9.53; IC=4.11-22.14; p<0.0001).<sup>49</sup>

Para os polimorfismos seleccionados dos genes *TNFRSF1B* e *CASP7* também não se verificaram quaisquer associações com o cancro da mama neste estudo e, até à data, não foram publicados quaisquer estudos sobre a associação destes SNP's com o cancro.

Apesar de neste estudo não se ter verificado qualquer associação com os polimorfismos seleccionados da *CASP9*, num estudo na população americana verificou-se que os indivíduos com o genótipo AA do polimorfismo *CASP9* Arg221Gln possuem um risco diminuído (OR=0.5; IC=0.3-0.9) para o melanoma múltiplo.<sup>50</sup>

Também neste estudo, para o polimorfismo *TP53* Arg72Pro não se verificou qualquer associação com a susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro da mama, tal como num estudo na população caucasiana da Europa Central não foi verificada qualquer associação deste polimorfismo com o linfoma Não-Hodgkin, assim como na população americana para o cancro da bexiga e para o osteosarcoma e na população sul-americana para o melanoma.<sup>42,51-53</sup> Contudo, existem estudos publicados que associam este polimorfismo a vários tipos de cancro. Para a população americana, verifica-se que os genótipos combinados de inúmeros polimorfismos do *TP53*, incluindo o deste estudo, se encontram associados a um aumento de risco para cancro do pulmão (OR=2.32; IC=1.18-4.57).<sup>54</sup> Também para o cancro gástrico numa população coreana, se verificou que os indivíduos com o genótipo variante do polimorfismo *TP53* Arg72Pro se apresentavam em maior risco (OR=3.9; IC=1.3-15.4; p=0.039), assim como para o melanoma numa população caucasiana (OR=3.17; IC=1.03-9.78).<sup>47,55</sup> Para o cancro nasofaríngeo verificou-se que os indivíduos portadores de pelo menos um alelo para a arginina se encontravam em menor risco (OR=0.33; IC=0.13-0.85; p<0.05).<sup>56</sup>

Todos estes resultados díspares, observados em diferentes estudos, podem estar relacionados com diferentes frequências alélicas dos polimorfismos, já que para diferentes populações podem existir diferentes frequências e diferentes susceptibilidades associadas a um alelo, assim como podem existir diferentes factores de risco. Mais se pode dizer, que inúmeras particularidades da população caucasiana portuguesa em relação às outras populações caucasianas – devido por exemplo ao seu historial de migrações e miscenização – podem ajudar a explicar as diferenças verificadas mesmo entre outras populações caucasianas e a população alvo deste estudo. Tudo isto parece explicar porque é que os estudos publicados nesta área não são todos concordantes entre si.

Para além dos resultados negativos deste estudo, também foi possível identificar uma associação estatisticamente significativa entre os indivíduos com o genótipo heterozigótico do polimorfismo *CASP10* Ile522Leu (OR<sub>ajustado</sub>=1.527; IC=1.065-2.188; p=0.021) e a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama. Assim, é sugerido que este polimorfismo representa um possível factor que aumenta o risco para o desenvolvimento de cancro da mama. Talvez por isso, as frequências genótípicas nos casos não estejam de acordo com o equilíbrio Hardy-Weinberg, já que existe um excesso de heterozigóticos nos casos em relação aos controlos.

Fisiologicamente, na via apoptótica a CASP10 é uma caspase iniciadora, encontrando-se numa posição próxima dos receptores de morte celular.<sup>22</sup> Em particular, o polimorfismo *CASP10* Ile522Leu envolve o último aminoácido da proteína CASP10 e a predição das funções proteicas usando o programa SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) não nos dá informação sobre a influência deste polimorfismo na expressão da proteína, restando por isso a dúvida.<sup>45</sup> Relativamente a estudos já efectuados em cancro da mama, verificou-se num estudo na população caucasiana alemã um risco reduzido dos indivíduos portadores de pelo menos um alelo variante, relativamente à susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro da mama (OR=0.62; IC=0.43-0.88; p=0.0076).<sup>57</sup> Já num estudo na população caucasiana britânica não se verificou qualquer associação com o risco para desenvolvimento de cancro da mama.<sup>45</sup> Relativamente a estudos de associações envolvendo este polimorfismo, verifica-se uma associação do SNP com o risco de melanoma e outros tipos de cancro, mas isto levanta a questão se será este polimorfismo que causa esta susceptibilidade acrescida ou se serão outros polimorfismos que possam estar em *linkage* com ele.<sup>45,58</sup> Devido aos resultados contraditórios, a significância deste polimorfismo na susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro da mama permanece assim bastante controversa, devido a possíveis diferenças entre populações caucasianas. Assim, faz sentido a realização de estudos de meta-análise que permitam reunir dados de diversas populações e obter conclusões mais fidedignas.

Neste estudo também se verificaram associações estatisticamente significativas entre os genótipos GG/GT/TT (OR<sub>ajustado</sub>=3.748; IC=1.216-11.554; p=0.021); GG/TT/AT (OR<sub>ajustado</sub>=4.399; IC=1.454-13.312; p=0.009) e GC/GG/AT (OR<sub>ajustado</sub>= 3.488; IC=1.137-10.700; p=0.029) da associação *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP/*CASP10* Ile522Leu e o risco para desenvolvimento de cancro da mama.

A nível fisiológico, as caspases-8 e caspase-10 estão envolvidas na via extrínseca da apoptose e a sua interacção directa com o domínio de morte da FADD, activa as caspases efectoras (3 e 7).<sup>58</sup> Estão ambas situadas num cluster de genes com domínios efectores de morte, no cromossoma humano 2q33-34, que contém também o gene *FLIP*, sugerindo que todos estes genes surgiram por duplicação *tandem*. Estas duplicações estão associadas a outras regiões cromossomais que estão alteradas na cancerigénese, podendo por isso reflectir alguma instabilidade genómica desta região cromossómica.<sup>59</sup> Assim, devido à relevância destas duas caspases iniciadoras, polimorfismos em ambas podem resultar em alterações na capacidade apoptótica das células. Num estudo, numa população caucasiana alemã, verificou-se que os

portadores do genótipo heterozigótico para ambas as variantes da associação *CASP8* Asp302His/*CASP10* Ile522Leu tinham um menor risco associado a cancro da mama (OR=0.39; IC=0.16-0.94; p=0.029).<sup>57</sup> Também num estudo, desta vez numa população americana, se verificou que os indivíduos cujo genótipo é Asp/del/Ile da associação *CASP8* Asp302His/-652 6N/*CASP10* Ile522Leu apresentam menor risco para o desenvolvimento de melanoma (OR=0.58; IC=0.44-0.78; p<0.0001).<sup>58</sup> Estes dados de estudos prévios não são concordantes com os resultados deste estudo já que, quando se verifica uma associação entre genótipos da associação *CASP8/CASP10*, estes representam uma diminuição de risco, enquanto no nosso estudo se verifica precisamente o oposto. Mais uma vez, isto pode dever-se a diferenças entre populações caucasianas e diferentes factores de risco entre elas, como já foi enunciado anteriormente.

Também os genótipos heterozigóticos e homozigóticos variantes do polimorfismo *CASP8* Asp302His foram associados a uma diminuição de risco para o cancro da mama pelo Consórcio Internacional de cancro da mama (OR=0.89; IC=0.85-0.94 e OR=0.74; IC=0.62-0.87, respectivamente) e por um estudo na população caucasiana britânica (OR=0.83; IC=0.74-0.94 e OR=0.58; IC= 0.39-0.88, respectivamente).<sup>43,45</sup> Já num estudo de cancro do cólon numa população americana foi verificado um aumento de risco para o polimorfismo *CASP8* Asp302His (OR=1.38; IC=1.19-1.60).<sup>60</sup> No entanto, existem outros estudos que não encontraram qualquer associação entre o polimorfismo *CASP8* Asp302His e cancro do ovário e colo-rectal.<sup>44,61</sup>

Devido à disparidade de resultados até agora publicados, para uma correcta validação dos resultados obtidos neste estudo, é necessário realizar estudos funcionais e estudos em outras populações e, se possível, com um maior número de indivíduos, para que se possam validar os resultados deste estudo de um modo global e afirmar com confiança que os polimorfismos identificados se associam realmente à susceptibilidade individual para o cancro da mama.

Contudo, os resultados deste estudo por si só sugerem que o polimorfismo *CASP10* Ile522Leu e os genótipos GG/GT/TT, GG/TT/AT e GC/GG/AT da associação *CASP8* Asp302His/Tyr12STOP/*CASP10* Ile522Leu podem estar envolvidos na susceptibilidade individual para o cancro da mama na população caucasiana portuguesa.

## Críticas e perspectivas futuras

Os estudos caso-controlo são uma ferramenta promissora na identificação de alelos que possam estar envolvidos na susceptibilidade para certos tipos de cancro. O poder destes estudos pode ser potenciado se estudarmos genes candidatos para determinadas funções celulares num tipo de cancro, como é o caso deste estudo.<sup>62</sup>

No entanto, estes estudos apresentam algumas limitações. Não nos podemos esquecer que, por vezes, os resultados podem ser falsos positivos (erro do tipo I), devido aos níveis de significância estatística utilizados ( $p \leq 0.05$ ) não serem os mais restritivos. A não reprodutibilidade deste tipo de estudos pode ocorrer por uma falha da potência estatística adequada, resultando em falsos negativos (erro do tipo II). Por isso são necessárias amostras com um grande número de indivíduos para detectar e confirmar, com um nível de significância estatístico adequado, as variantes genéticas que estão associadas a um aumento moderado do risco.<sup>63</sup> O tamanho relativamente pequeno da amostragem parece estar associado à perda de significância de algumas associações, após o ajustamento com as variáveis confundentes, assim como ao fraco emparelhamento de casos e controlos no que se refere a hábitos alcoólicos, pelo que é aconselhável o aumento do tamanho da amostra. A utilização de estudos de associação tem sido criticada por diversas razões, nomeadamente pelo facto da determinação retrospectiva de uma associação entre ser portador de um alelo ou genótipo e uma dada doença, não querer necessariamente dizer que exista uma ligação etiológica entre eles. Apenas estudos prospectivos em grandes populações primariamente saudáveis podem fornecer uma evidência directa e fidedigna. Existem também várias maneiras de aumentar a credibilidade entre a associação de genótipos polimórficos e fenótipos, sendo a mais utilizada a meta-análise que permite separar as associações ao acaso das evidências fidedignas.<sup>16</sup> O impacto de estudos de associação pode ser aumentado se se prosseguir para o estudo da genómica funcional dos alelos envolvidos na susceptibilidade para o tipo de cancro em estudo. Isto exige sistemas flexíveis e robustos que sejam capazes de explorar diferentes actividades dos genes, as quais possam justificar possíveis papéis das variantes alélicas em certos tipos de cancro.<sup>62</sup>

Contudo, este estudo sugere uma abordagem inovadora aos polimorfismos das vias apoptóticas que possam estar associados ao desenvolvimento de cancro da mama, já que não existem até à data estudos publicados que englobem genes de todos os níveis de acção das diferentes vias apoptóticas e a sua associação com o cancro da mama.

## Referências bibliográficas

1. Loktionov, A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett.* **208**, 1-33 (2004).
2. Ponder, B. A. Cancer genetics. *Nature* **411**, 336-341 (2001).
3. Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* **21**, 167-223 (2000).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
5. Kamangar, F., Dores, G. M. & Anderson, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2137-2150 (2006).
6. Keen, J. C. & Davidson, N. E. The biology of breast carcinoma. *Cancer* **97**, 825-833 (2003).
7. Dumitrescu, R. G. & Cotarla, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.* **9**, 208-221 (2005).
8. de Jong, M. M. *et al.* Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J. Med. Genet.* **39**, 225-242 (2002).
9. Balmain, A., Gray, J. & Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 238-244 (2003).
10. Easton, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087-1093 (2007).
11. Rothman, N. *et al.* The use of common genetic polymorphisms to enhance the epidemiologic study of environmental carcinogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1471**, C1-10 (2001).
12. Oldenburg, R. A., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C. J. & Devilee, P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **63**, 125-149 (2007).
13. Tabor, H. K., Risch, N. J. & Myers, R. M. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 391-397 (2002).
14. Crawford, D. C. & Nickerson, D. A. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu. Rev. Med.* **56**, 303-320 (2005).
15. Syvanen, A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 930-942 (2001).
16. Tempfer, C. B., Hefler, L. A., Schneeberger, C. & Huber, J. C. How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer? *Gynecol. Endocrinol.* **22**, 155-159 (2006).

17. Wang, Z. B., Liu, Y. Q. & Cui, Y. F. Pathways to caspase activation. *Cell Biol. Int.* **29**, 489-496 (2005).
18. Peters, J., Loud, J., Dimond, E. & Jenkins, J. Cancer genetics fundamentals. *Cancer Nurs.* **24**, 446-461 (2001).
19. Cho, S. G. & Choi, E. J. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 24-27 (2002).
20. Sjöström, J. & Mäkelä, T. Apoptosis and the Cell Cycle in Human Disease. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-6 (2006).
21. Philchenkov, A., Zavelevich, M., Krocak, T. J. & Los, M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp. Oncol.* **26**, 82-97 (2004).
22. Müllauer, L. *et al.* Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat. Res.* **488**, 211-231 (2001).
23. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 405-413 (2007).
24. Ng, P. W., Porter, A. G. & Janicke, R. U. Molecular cloning and characterization of two novel pro-apoptotic isoforms of caspase-10. *J Biol. Chem.* **274**, 10301-10308 (1999).
25. Oliver, L. & Vallette, F. M. The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resist. Updat.* **8**, 163-170 (2005).
26. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922-2933 (2001).
27. Peter, M. E. & Krammer, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death. Differ.* **10**, 26-35 (2003).
28. Creagh, E. M., Conroy, H. & Martin, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.* **193**, 10-21 (2003).
29. Green, D. R. & Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629 (2004).
30. Bao, Q. & Shi, Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death. Differ.* **14**, 56-65 (2007).
31. Schafer, Z. T. & Kornbluth, S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev. Cell* **10**, 549-561 (2006).
32. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231-241 (2008).
33. Vousden, K. H. & Lane, D. P. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 275-283 (2007).

34. Ding, H. F. *et al.* Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol. Chem.* **275**, 38905-38911 (2000).
35. Healy, D. G. Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide. *Lancet Neurol.* **5**, 701-707 (2006).
36. Lange, K. *et al.* Mendel Version 4.0: A complete package for the exact genetic analysis of discrete traits in pedigree and population data sets. *Amer J Hum Genetics* **69**, A1886 (2001).
37. Storey, J. D. & Tibshirani, R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 9440-9445 (2003).
38. Sole, X., Guino, E., Valls, J., Iniesta, R. & Moreno, V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* **22**, 1928-1929 (2006).
39. Singletary, K. W. & Gapstur, S. M. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* **286**, 2143-2151 (2001).
40. Lee, S. G. *et al.* TNF/LTA polymorphisms and risk for gastric cancer/duodenal ulcer in the Korean population. *Cytokine* **28**, 75-82 (2004).
41. Hajra, K. M. & Liu, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis.* **9**, 691-704 (2004).
42. Bittenbring, J. *et al.* MDM2 gene SNP309 T/G and p53 gene SNP72 G/C do not influence diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma onset or survival in central European Caucasians. *BMC. Cancer* **8**, 116 (2008).
43. Cox, A. *et al.* A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat. Genet.* **39**, 352-358 (2007).
44. Pittman, A. M. *et al.* CASP8 variants D302H and -652 6N ins/del do not influence the risk of colorectal cancer in the United Kingdom population. *Br. J. Cancer* **98**, 1434-1436 (2008).
45. MacPherson, G. *et al.* Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1866-1869 (2004).
46. Kruger, S. *et al.* The p53 codon 72 variation is associated with the age of onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *J Med. Genet.* **42**, 769-773 (2005).
47. Stefanaki, I. *et al.* p53 codon 72 Pro homozygosity increases the risk of cutaneous melanoma in individuals with dark skin complexion and among noncarriers of melanocortin 1 receptor red hair variants. *Br. J Dermatol.* **156**, 357-362 (2007).
48. Gaudet, M. M. *et al.* Genetic variation in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha (TNF-LTA) and breast cancer risk. *Hum. Genet.* **121**, 483-490 (2007).
49. Kohaar, I. *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TNF-LTA locus with breast cancer risk in Indian population. *Breast Cancer Res. Treat.* (2008).

50. Hosgood, H. D., III *et al.* Caspase polymorphisms and genetic susceptibility to multiple myeloma. *Hematol. Oncol.* (2008).
51. Wu, X. *et al.* Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 464-479 (2006).
52. Savage, S. A. *et al.* Germ-line genetic variation of TP53 in osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **49**, 28-33 (2007).
53. Ortega, M. M. *et al.* GSTM1 and codon 72 P53 polymorphism in multiple myeloma. *Ann. Hematol.* **86**, 815-819 (2007).
54. Mechanic, L. E. *et al.* Common genetic variation in TP53 is associated with lung cancer risk and prognosis in African Americans and somatic mutations in lung tumors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **16**, 214-222 (2007).
55. Yi, S. Y. & Lee, W. J. A p53 genetic polymorphism of gastric cancer: difference between early gastric cancer and advanced gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **12**, 6536-6539 (2006).
56. Tsai, M. H. *et al.* Prognostic significance of the proline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* **112**, 116-119 (2002).
57. Frank, B. *et al.* Association of the CASP10 V410I variant with reduced familial breast cancer risk and interaction with the CASP8 D302H variant. *Carcinogenesis* **27**, 606-609 (2006).
58. Li, C. *et al.* Genetic variants and haplotypes of the caspase-8 and caspase-10 genes contribute to susceptibility to cutaneous melanoma. *Hum. Mutat.* (2008).
59. Shin, M. S. *et al.* Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **99**, 4094-4099 (2002).
60. Goodman, J. E. *et al.* Exploring SNP-SNP interactions and colon cancer risk using polymorphism interaction analysis. *Int. J. Cancer* **118**, 1790-1797 (2006).
61. Ramus, S. J. *et al.* Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **123**, 380-388 (2008).
62. Rueff, J., Gaspar, J. & Kranendonk, M. DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer. *Biol. Chem.* **383**, 923-932 (2002).
63. Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1382-1396 (2006).

## Anexos

### Inquérito

Exmº Senhor/a

O Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas encontra-se envolvido num projecto de investigação com vista a identificar factores de pré-disposição para doenças do foro oncológico.

A identificação destes factores de risco genético poderá vir a ser de extrema importância uma vez que poderá permitir no futuro a identificação de indivíduos de risco para este tipo de patologia. Esta abordagem, a ser conseguida, poderá permitir um conjunto de dados visando, num futuro próximo, o rastreio precoce de indivíduos com risco acrescido para este tipo de patologias e consequentemente o diagnóstico precoce.

Em função destes objectivos solicitamos a sua colaboração, a qual se traduzirá apenas pela colheita de um pequeno volume de sangue e a resposta a um pequeno questionário confidencial e anónimo.

Agradecendo antecipadamente a sua colaboração,

Professor Doutor José Rueff

Professor Catedrático

Faculdade de Ciências Médicas da UNL

### **DECLARAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_, declaro ter sido devidamente esclarecido sobre a natureza e objectivos do estudo “Polimorfismos genéticos: potenciais factores de risco para doença oncológica” tendo decidido colaborar voluntariamente neste estudo.

Lisboa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

(assinatura)

## INQUÉRITO

Código: \_\_\_\_\_ Data de colheita: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Local de residência: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Data de diagnóstico: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Realizou transfusões de sangue nos últimos 12 meses? (Se sim, qual a razão?) \_\_\_\_\_

Qual o seu tipo de alimentação? \_\_\_\_\_

Hábitos alcoólicos (quantidade/anos de consumo): \_\_\_\_\_

Hábitos tabágicos (cigarros por dia/anos de consumo): \_\_\_\_\_

Tomou anticoncepcionais orais? (quais/duração): \_\_\_\_\_

Existem antecedentes familiares de cancro, nomeadamente da mama? \_\_\_\_\_

Especifique. \_\_\_\_\_

Idade da menarca: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Idade da menopausa: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Número de filhos: \_\_\_\_ Data de nascimento de cada um dos filhos: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Número de gestações: \_\_\_\_ Amamentou os seus filhos? Durante quanto tempo? \_\_\_\_\_

Foi-lhe diagnosticada anteriormente qualquer outro tipo de patologia oncológica? (Se sim, qual? Em que data?) \_\_\_\_\_

Outra patologia associada: \_\_\_\_\_