UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Fernanda Paula de Carvalho

**ESTUDO DE DANOS OXIDATIVOS ESPONTÂNEOS NO DNA DE PACIENTES COM
LESÕES MALIGNAS E BENIGNAS DE MAMA**

Ribeirão Preto
2011

Fernanda Paula de Carvalho

**ESTUDO DE DANOS OXIDATIVOS ESPONTÂNEOS NO DNA DE PACIENTES COM
LESÕES MALIGNAS E BENIGNAS DE MAMA**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Catarina
Satie Takahashi.

Ribeirão Preto

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

CARVALHO, Fernanda Paula

Estudo de danos oxidativos espontâneos no DNA de pacientes com lesões benignas e malignas de mama. Ribeirão Preto, 2011.

87p.: 30cm

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão/USP.

1. Câncer de mama. 2. Citogenética. 3. Estresse Oxidativo. 4. Adenose Esclerosante. 5. Danos Espontâneos no DNA.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/USP – FAEPA-HCRP
- Faculdade Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP
- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP/USP

***Dedico este trabalho aos meus
zelosos pais Fernando e Nilza.
Obrigada por mudarem minha vida
ao aceitarem ser minha família!***

Agradecimento Especial

Agradeço a todas as mulheres, que mesmo vivendo um momento tão difícil em suas vidas se disponibilizaram prontamente a participar desta pesquisa, demonstrando um profundo ato de generosidade.

Agradecimentos

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi**, pela grande oportunidade a mim oferecida em realizar este trabalho e fazer parte de seu laboratório. Agradeço imensamente o apoio, a confiança, e sobretudo, por também mudar a minha vida ao aceitar ser minha orientadora. Muito obrigada!

Aos **Profs. Drs. Hélio H. A. Carrara e Jurandyr Moreira de Andrade** pela colaboração imprescindível na execução deste trabalho, pelos ensinamentos e pela enorme simpatia com a qual me receberam no ambulatório.

À **Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, pelo convívio, pelos ensinamentos e por dividir conosco um pouco da sua experiência na pesquisa científica.

Ao **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP, pela atenção e apoio despendidos.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP, agradeço não somente pelo apoio, amizade e bom humor sempre, mas principalmente pelo seu empenho na luta pelo crescimento do curso. Agradeço também sua enorme dedicação em promover todos os anos o Curso de Verão da Genética, que foi para mim e para tantos outros alunos, a porta de entrada para pós-graduação nesta universidade.

Aos **Membros da Banca Examinadora**, pela disposição em analisar este trabalho e trazer importantes contribuições.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana R. P. Nalon, Maria Aparecida O. S. Elias e Silvia H. Costa**, pela grande ajuda, atenção e amizade.

A toda **equipe de médicos, enfermeiras e auxiliares administrativos** do Ambulatório de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP-USP) pelo auxílio oferecido durante as coletas.

Ao **Prof. Dr. Hélio Vannucchi**, pelo apoio permitindo a realização de parte da análise bioquímica deste trabalho no Laboratório de Nutrição do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

À **Renata Cristina Lataro**, técnica do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, pela gentil realização das dosagens de folato e vitamina B-12.

À **Mônica Silva de Souza Meirelles**, especialista do Laboratório de Nutrição do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, pela gentil realização da dosagem de Glutathione Peroxidase.

A **Luiz Augusto da Costa Júnior e Sueli Aparecida Neves**, técnicos do nosso Laboratório de Citogenética e Mutagenese, por serem essas queridas “figuras”, pela cooperação, amizade, conselhos e risadas!

A **Dona Vera**, sempre tão cuidadosa com limpeza do nosso laboratório, agradeço pelo carinho, gentileza, e dedicação.

À **Dr^a. Raquel Alves dos Santos**, pela amizade, disposição e pela admirável competência em ajudar e ensinar. Grande parte do que aprendi neste laboratório foi graças a seus ensinamentos, desde o primeiro momento quando elaborávamos o meu projeto, até a execução das técnicas. Seu apoio foi fundamental!

À **Dr^a. Aline Poersch**, pelo companheirismo, amizade, conselhos, enfim, pelos bons momentos. Seus ensinamentos contribuíram de forma decisiva para a realização deste trabalho. Obrigada por tudo!

À **Dr^a. Fernanda Caetano**, pela amizade, pelo carinho, e pelo grande auxílio na padronização das minhas reações de PCR!

A todos que fazem (ou fizeram) parte do Laboratório de Citogenética e Mutagenese: **Ana Paula, Dr. Cristiano (Profeta), Danillo (Bollor), Danilo (Xitão), Felipe (Magal), Flavinha (Druga Branca), Giovana (Druga Mulata), Gustavo (Polvilho), Leonardo (Nano Léo), Dr^a. Patrícia, Paulinha (Druga Oriental), Paulo (Cop) e Tiago (Drugo)**, obrigada pelo convívio, pela ajuda e pelo imenso carinho com que me acolheram! Para mim é uma honra pertencer a essa grande família. ☺

Ao nosso grande amigo **Daniel Macedo**, pela amizade desde os tempos do Curso de Verão em 2008.

À **Edilene Andrade**, minha querida amiga, colega de departamento, conterrânea, vizinha e torcedora do Sport Club do Recife! Sua amizade me fortalece desde o início, não somente por compartilharmos o mesmo sotaque arrastado, mas também por dividirmos as mesmas dificuldades. Obrigada pelo companheirismo, pela confiança, pela força!

A todo o pessoal do Laboratório de Genética Bioquímica do Prof. Dr. Aguinaldo Simões: **Ana Lúcia, Cláudia, Cláudia Caixeta, Edna, Flávia, Juliana, Léo, Maria e Natália**, agradeço o carinho, amizade e colaboração.

A **Adriane Feijó Evangelista (Feijão)**, pelo incentivo, amizade e simpatia desde o primeiro dia do Curso de Verão em 2008. Graças ao seu “apoio moral” hoje estou aqui!

Às minhas eternas amigas estrangeiras **Blanca e Dania**, verdadeiras companheiras nas aventuras ribeirão-pretanas! Não tenho palavras para expressar a força da nossa amizade... E mesmo distante, espero tê-las sempre na minha vida daqui em diante!

Aos grandes amigos que aqui encontrei: **Antuanett, Arcélia, Carla “Bolívia”, Daria “Passione”, Isadora “Xuxu”, Jú Cafer, Karla & Cristiano, Karen, Kelly, Laiane, Lily, Luciana, Madeleine, Nirza, Román e Violeta**, estrangeiros e brasileiros de todas as partes, agradeço pelos momentos maravilhosos, e por me proporcionarem aprender e experimentar novos idiomas, culturas, sotaques, sabores...

Aos inusitados amigos que aqui (graças à internet) encontrei: **Caetano, Cris & Ricardo, Fred, James, Lagarto e Marcos**, companheiros nas aventuras de RPG, agradeço pela paciência e sobretudo pela alegria dos domingos!

Aos grandes amigos que em Recife deixei, **Nadja, Naedson e Marcelo**, agradeço pela torcida à distância, pelas palavras de estímulo, e pelos eternos laços de amizade.

Ao meu querido amigo **Eriton**, pelo carinho sempre...

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,
MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DE TUMORES MAMÁRIOS: LESÕES MALIGNAS E BENIGNAS	1
1.2 RADICAIS LIVRES E O PAPEL DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GSH-Px).....	3
1.3 REPARO DE DANOS OXIDATIVOS NO DNA PELO GENE <i>hOGG1</i>	5
1.4 METABOLISMO DA METIONINA: INFLUÊNCIAS DO GENE <i>AHCY</i> , DO FOLATO E DA VITAMINA B12 NA CARCINOGENESE	7
1.5 ENSAIO COMETA E TESTE DO MICRONÚCLEO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 GERAL	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 CASUÍSTICA	13
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	14
3.3 AVALIAÇÃO MOLECULAR	14
3.3.1 <i>Extração e quantificação de DNA genômico</i>	14
3.3.2 <i>Deteção do polimorfismo hOGG1 Ser326Cys</i>	15
3.3.3 <i>Deteção do polimorfismo AHCY Arg38Trp</i>	15
3.4 AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA	16
3.4.1a <i>Citocalasina B (Cit-B)</i>	16
3.4.1b <i>Teste do Micronúcleo</i>	17
3.4.1c <i>Índice de Divisão Nuclear</i>	18
3.4.2a <i>Ensaio Cometa Alcalino</i>	18
3.4.2b <i>Ensaio Cometa para detecção de danos oxidativos</i>	20
3.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	20
3.5.1 <i>Separação de plasma e concentrado eritrocitário</i>	20
3.5.2 <i>Ácido fólico e vitamina B12 no plasma</i>	21
3.5.3 <i>Glutationa Peroxidase em hemolisado eritrocitário</i>	21
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1 ANÁLISE MOLECULAR: GENES <i>hOGG1</i> E <i>AHCY</i>	23
4.1.1 <i>Caracterização geral da amostra total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias utilizadas na análise molecular</i>	23
4.1.2 <i>Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos nos genes hOGG1 e AHCY na amostra total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias</i>	26
4.1.3 <i>Distribuição dos genótipos referentes ao polimorfismo no gene hOGG1 na amostra total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias fumantes e/ou consumidoras de álcool</i>	28
4.1.4 <i>Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos dos genes hOGG1 na amostra total de pacientes com CDI de acordo com características anatomopatológicas</i>	30
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS (FOLATO, VITAMINA B12 E GSH-Px) E CITOGENÉTICAS (MN, IDN E ENSAIO COMETA)	32
4.2.1 <i>Caracterização geral da sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias utilizadas na análise bioquímica e citogenética</i>	32
4.2.2 <i>Análise das dosagens de folato, vitamina B12 e GSH-Px na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias</i>	34

4.2.3 Análise da eficiência da enzima OGG1 em detectar danos oxidativos pelo Ensaio Cometa	36
4.2.4 Análise da extensão dos níveis basais de lesões no DNA (Ensaio Cometa) e danos nos cromossomos (Teste do MN e IDN) na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias	37
4.3 ANÁLISE DAS INFLUÊNCIAS MOLECULARES E BIOQUÍMICAS SOBRE OS DADOS CITOGENÉTICOS.....	40
4.3.1 Distribuição dos genótipos referentes ao polimorfismo Ser326Cys hOGG1 na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias utilizadas na análise bioquímica e citogenética.....	40
4.3.2 Análise dos níveis basais de danos no DNA e nos cromossomos, em relação ao polimorfismo Ser326Cys hOGG1 na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias.....	42
4.3.3 Análise da correlação entre idade, níveis basais de lesões no DNA, danos cromossômicos, e dosagens de folato, vitamina B-12 e GSH-Px na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e controles.....	45
5. DISCUSSÃO	48
5.1 OS POLIMORFISMOS SER326CYS hOGG1 E ARG38TRP AHCY E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA	48
5.2 DANOS OXIDATIVOS ESPONTÂNEOS NO DNA E MECANISMOS DE PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE	51
5.2.1 Caracterização geral e frequência do polimorfismo Ser326Cys hOGG1 da sub-amostra utilizada nas análises bioquímica e citogenética.....	51
5.2.2 Níveis eritrocitários de GSH-PX e níveis plasmáticos de folato e vitamina B12...	52
5.2.3 Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa.....	55
6. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxoG - 8-oxoguanina

ADA - adenosina desaminase

AE - adenose esclerosante

AK - adenosina quinase

BER - reparo por excisão de base

BHMT - betaína-homocisteína-metiltransferase

CBS - cistationina β -sintase

CDI - carcinoma ductal invasivo

Cit-B - citocalasina B

CM - câncer de mama

dbSNP – base de dados de polimorfismos de nucleotídeo único

DMSO - dimetilsufóxido

EDTA – ácido etileno diaminotetracético

GSH - glutationa

GSH-Px - glutationa peroxidase

GSH-Rd - glutationa redutase

HCRP-USP - Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

IC – intervalo de confiança

IDN - índide de divisão nuclear

kb - kilobases

MN – micronúcleo

MS - metionina sintetase

MTase - metiltransferases

OR – *odds ratio*

pb – pares de base

PCR - reação em cadeia da polimerase

PFPG - parentes femininos de primeiro grau

RFLP - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

r.p.m. – rotações por minuto

RROs - radicais reativos de oxigênio

SAH - S-adenosilhomocisteína

SAHH - S-adenosilhomocisteína hidrolase

SAM - S-adenosilmetionina

TBH - t-butil-hidroperóxido

THF 5-CH₃ - 5-metiltetrahidrofolato

RESUMO

CARVALHO, F. P. **Estudo de danos oxidativos espontâneos no DNA de pacientes com lesões malignas e benignas de mama.** 2011. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, 2011.

O estresse oxidativo é um dos principais responsáveis pela produção de danos espontâneos no DNA, os quais podem levar à origem de diversas neoplasias, inclusive câncer de mama (CM). Além disso, dentre os diversos fatores de risco já estabelecidos para a ocorrência do CM em mulheres, como idade, hormônios, dieta e fatores genéticos, alguns tipos de lesões benignas mamárias também aparecem como importantes elementos predisponentes. Dessa forma, a pesquisa de genes envolvidos com a produção ou reparo de danos oxidativos, bem como o estudo de elementos bioquímicos relacionados à proteção antioxidante em pacientes com lesões malignas e benignas de mama são fundamentais para o entendimento do mecanismo geral que conduz ao estresse oxidativo no CM. Os objetivos deste estudo foram determinar a frequência dos polimorfismos Ser326Cys *hOGG1* e Arg38Trp *AHCY* pela técnica de PCR-RFLP; avaliar os níveis sanguíneos de folato, vitamina B12 e glutathione peroxidase (GSH-Px); examinar o grau de lesões oxidativas espontâneas no DNA pelo Teste do Micronúcleo (MN), Índice de Divisão Nuclear (IDN) e Ensaio Cometa em linfócitos; e por fim, verificar se os polimorfismos e os elementos bioquímicos estudados exercem influência sobre tais danos oxidativos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 55 voluntárias sadias, 10 pacientes com adenose esclerosante (AE) e 54 pacientes com carcinoma ductal invasivo (CDI) não tratadas. Os polimorfismos foram analisados em todas as amostras. As análises bioquímica e citogenética foram realizadas numa sub-amostra composta por 21 mulheres sadias, 10 pacientes com AE e 14 pacientes com CDI. No Ensaio Cometa foi aplicada a endonuclease OGG1 para detecção de danos oxidativos. Não foi observada relação entre os alelos Ser326Cys *hOGG1* e Arg38Trp *AHCY* e o risco de CM. O número de indivíduos portadores do alelo Arg38Trp *AHCY* foi insuficiente para as demais análises. Não houve deficiência ou excesso de folato e vitamina B12 entre as voluntárias. Pacientes com CDI apresentaram níveis de GSH-Px e frequência de MNs significativamente maiores do que mulheres sadias. Não houve associação entre o grau de danos espontâneos no DNA e risco de CM. O alelo Ser326Cys *hOGG1* não interfere na produção de lesões espontâneas no DNA. O folato e a vitamina B12, em níveis normais, podem provocar instabilidade genômica em pacientes com AE.

Palavras-chave: Câncer de Mama, Citogenética, Estresse Oxidativo, Adenose Esclerosante, Danos Espontâneos no DNA.

ABSTRACT

CARVALHO, F. P. **Spontaneous oxidative damage in DNA of patients with malignant and benign breast lesions**. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, 2011.

Oxidative stress is one of the most important generators of DNA damage, which can lead to carcinogenesis of many cancer types, including breast cancer (BC). Several risk factors were established for occurrence of BC in women, such as age, hormones, diet and genetic factors, however, certain types of benign breast lesions also appear as important predisposing factors. Thus, the search for genes involved in production and repair of oxidative damage, as well as the study of biochemical elements related to the antioxidant protection in patients with malignant and benign breast lesions are fundamental for understanding the general mechanism leading to oxidative stress in the BC. The aims of this study were to determine the frequency of Ser326Cys *hOGG1* and Arg38Trp *AHCY* genetic polymorphisms by PCR-RFLP to investigate their association with BC susceptibility; evaluate folate, vitamin B-12 and glutathione peroxidase (GSH-Px) blood levels; examine the extension of spontaneous oxidative damage in DNA by Micronucleus Test (MN), Nuclear Division Index (NDI) and Comet Assay with lymphocytes; and finally, verify if polymorphisms and biochemicals investigated may influence on oxidative damage. Peripheral blood samples of 119 volunteers were collected: 55 healthy women, 10 patients with sclerosing adenosis (SA) and 54 untreated patients with invasive ductal carcinoma (IDC). Molecular analysis was performed in all samples. Biochemical and cytogenetic analysis were performed on a sub-sample of 45 individuals comprised 21 healthy women, 10 AE patients and 14 ICD patients, chosen at random from the total samples. In Comet Assay, endonuclease OGG1 was applied to detect oxidative damage. No relationship was found between Ser326Cys *hOGG1* and Arg38Trp *AHCY* alleles and risk for BC. The number of individuals carrying the allele Arg38Trp *AHCY* was insufficient for further analysis. There was no deficiency or excess in folate and vitamin B12 levels among the volunteers. GSH-Px levels and frequencies of MNs were significantly higher in ICD patients than healthy women. There was no association between the degree of spontaneous DNA damage and risk for BC. Ser326Cys *hOGG1* allele does not interfere on production of spontaneous DNA lesions. Normal levels of vitamin B12 and folate may cause genomic instability in AE patients.

Keywords: Breast Cancer, Cytogenetic, Oxidative Stress, Sclerosing Adenosis, DNA Spontaneous Damage.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais de tumores mamários: lesões malignas e benignas

No Brasil, o câncer de mama (CM) é a neoplasia que mais causa mortes entre as mulheres. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2009), o número de casos novos esperados para o ano de 2010, cujo número é válido também para o ano de 2011, é de 49.240, um risco estimado de 49,27 casos a cada 100.000 mulheres. A maior incidência de CM está na região Sudeste, com risco estimado de 64,54 casos novos a cada 100.000 mulheres. No estado de São Paulo, o risco estimado é de 68,04 casos novos para cada 100.000 mulheres.

Diversos fatores estão relacionados à incidência de neoplasias mamárias: idade, eventos reprodutivos (menarca precoce, menopausa tardia, gravidez e amamentação), hormônios exógenos, dieta, tabagismo, consumo de álcool, histórico de câncer familiar, exposição a agentes mutagênicos ambientais, fatores genéticos e epigenéticos (Yang *et al.*, 2001; Dumitrescu & Cotaria, 2005). Além disso, vários tipos de lesões malignas podem ocorrer na mama, pois diversos tecidos fazem parte da sua constituição: tecido epitelial escamoso e glandular, e tecido conjuntivo mesenquimal (Basegio, 1999).

De modo geral, os carcinomas na mama podem se originar na unidade ductolobular terminal ou fora dela. A maioria das neoplasias malignas com origem na unidade ductolobular terminal assume um padrão reconhecido como ductal, sendo denominado como carcinoma ductal invasivo (CDI). Presume-se que o carcinoma mamário permanece um tempo como carcinoma *in situ* antes de tornar-se invasivo (Basegio, 1999; Arpino *et al.*, 2005; Worsham *et al.*, 2007).

Por outro lado, sabe-se que a grande maioria das lesões que ocorre nas mamas é benigna, sendo que apenas alguns tipos estão associados ao risco de desenvolvimento de neoplasia invasiva. Além disso, a incidência de lesões benignas

começa a aumentar durante a segunda década de vida e decai na quarta e quinta décadas, ao contrário das lesões malignas, para as quais a incidência continua a crescer após a menopausa, embora em ritmo menos acelerado (Guray & Sahin, 2006).

As lesões benignas de mama correspondem a um conjunto de formas histológicas usualmente subdivididas em: lesões não proliferativas; lesões proliferativas sem atipia; e hiperplasias atípicas, havendo um aumento no risco de câncer associado às lesões proliferativas ou atípicas. Dessa forma, algumas patologias benignas na mama também são observadas como um importante fator de risco para o desenvolvimento de malignidade mamária mais adiante (Rohan *et al.*, 1998; Arpino *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2005).

Dentre as lesões proliferativas sem atipias estão diversos tipos de alterações fibrocísticas, especialmente a adenose esclerosante (AE). Esta é definida como uma lesão lobular benigna de desordem acinar, mioepitelial, e de elementos conectivos, podendo tal lesão assemelhar-se microscopicamente ao carcinoma infiltrante. Além disso, a AE pode se manifestar como nódulo palpável ou achado suspeito na mamografia, e está fortemente associada a vários tipos de lesões proliferativas, inclusive coexistindo com carcinomas *in situ* e invasivo. Sendo assim, alguns estudos apontaram que a AE parece ser um fator de risco para câncer invasivo de mama (Dupont *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 2003; Guray & Sahin, 2006).

Dessa forma, devido à grande heterogeneidade celular e molecular dos tumores da mama, bem como o número de genes potencialmente envolvidos no controle do crescimento celular, morte e diferenciação, há um grande esforço para se estudar em conjunto alterações genéticas simultâneas (Sørli *et al.*, 2001).

1.2 Radicais livres e o papel da enzima Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

O processo neoplásico é desencadeado geralmente pelo acúmulo de danos no DNA, que ao longo do tempo inativam genes supressores tumorais e ativam protooncogenes, levando a instabilidade celular e perda do controle replicativo (Hoeijmakers, 2001). Diversos agentes exógenos como radiações ionizantes e agentes químicos, e elementos endógenos como radicais livres gerados durante o metabolismo celular podem danificar o material genético (Ames *et al.*, 1995; Gent *et al.*, 2001). As moléculas reativas mais importantes são os radicais reativos de oxigênio (RROs), que são produzidos principalmente durante a respiração celular. Eles também são gerados na célula por exposição às radiações ionizantes e aos produtos químicos carcinogênicos. Essas moléculas instáveis incluem o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio *singlet* (Oberley, 2002; Turrens, 2003; Nohmi *et al.*, 2005).

Devido à grande capacidade de reagir com diversos componentes celulares como DNA, proteínas e lipídios de membrana, as células dispõem de vários mecanismos de defesa para combater o estresse oxidativo. Assim, o sistema de enzimas antioxidantes é bastante complexo, composto por elementos de baixo peso molecular (vitaminas E, C, A), enzimas antioxidantes primárias (superóxido dismutases de zinco-cobre e manganês, catalase, glutathione peroxidase), enzimas antioxidantes secundárias (glutathione redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase), e também os sistemas glutaredoxina (glutathione reduzida e sua forma oxidada) e tioredoxina (Fang *et al.*, 2002; Oberley, 2002). Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante (Jones, 2008).

Sendo uma das primeiras enzimas a atuar, a glutathione peroxidase (GSH-Px) cataliza a redução de H_2O_2 em H_2O , utilizando glutathione na sua forma reduzida (GSH) como substrato:

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico, que pode ser obtida: na dieta; ser sintetizada pelo ciclo γ -glutamil na maioria das células; ou ser sintetizada *de novo* pelo ciclo da metionina no fígado (Fang *et al.*, 2002; Lu, 2009; Martinov *et al.*, 2009). O fígado é o maior produtor e exportador de GSH sendo, portanto, o principal responsável pelo abastecimento de GSH no sangue (Wu *et al.*, 2004; Giustarini *et al.*, 2009).

Quando a GSH é oxidada pela GSH-Px, há a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, formando GSSG. Diminuição dos níveis endógenos de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão elevada de GSH/GSSG para garantir a disponibilidade de GSH. Para tanto, é necessária a constante regeneração do GSH, que se dá por meio da ação da enzima glutathiona redutase (GSH-Rd) (Ferreira & Matsubara, 1997; Shan *et al.*, 1990; Lu, 2009) (Figura 1).

Figura 1. Mecanismo de proteção celular contra $H_2O_2 + O_2$, por meio das enzimas Catalase, GSH-Px e GSH-Rd. (Adaptado de Ferreira & Matsubara, 1997)

O estresse oxidativo modula a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, e também regula a síntese de moléculas antioxidantes por meio de diversas vias metabólicas (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

Por atuar diretamente na neutralização de RROs, a GSH-Px é considerada um importante biomarcador de estresse oxidativo (Andersen *et al.*, 1997; Gromadzinska *et al.*, 2008). Dessa forma, as alterações na atividade da GSH-Px já foram estudadas em diversos tipos de neoplasias como câncer de mama (Rajneesh *et al.*, 2008), neoplasias hematológicas (Paul & De, 2010) e câncer de próstata (Arsova-Saradinovska *et al.*, 2009).

1.3 Reparo de danos oxidativos no DNA pelo gene *hOGG1*

O sistema antioxidante não é capaz de neutralizar toda a produção de RROs intracelular. Dessa forma, esses radicais ao interagirem com o DNA produzem uma variedade de bases modificadas, sendo a 8-oxoguanina (8-oxoG) a base oxidada mais bem caracterizada. Estima-se que cerca de 10^3 8-oxoG sejam geradas por dia nas células normais. Durante a síntese de DNA *in vitro* foi observado que o dATP e o dCTP podem ser incorporados a fita complementar em oposição ao 8-oxoG. Assim, a adição de dATP ao invés de dCTP durante a replicação de DNA pode induzir transversões G:C para T:A (Nohmi *et al.*, 2005).

A maior parte do conhecimento existente sobre os mecanismos de reparo para a 8-oxoG foi obtida em estudos com *Escherichia coli*. As bactérias possuem um sistema integrado de reparo por excisão de base (BER), além de mecanismos preventivos para evitar danos às guaninas. Este sistema é constituído por três componentes: uma enzima 8-oxoG glicosilase liase apurínica/apirimídica chamada MutM ou proteína Fpg, uma DNA adenina glicosilase chamada MutY, e uma 8-oxodGTPase, MutT (Boiteux *et al.*, 1992; Croteau & Bohr, 1997; Radicella *et al.*, 1997).

Homólogos funcionais para cada uma dessas enzimas foram identificados em eucariotos superiores e foram nomeados como OGG1, MUTYH e MTH1 respectivamente. Os RROs produzem 8-oxoG (representado como GO na Figura 2) no DNA e 8-OH-dGTP em nucleotídeos livres. As lesões GO podem ser removidas pela enzima OGG1, e a etapa seguinte será restaurar o par original G:C. Se não for removido, GO pode gerar um erro de pareamento durante a síntese de DNA resultando no par GO:A. A adenina oposta ao GO pode ser removida pela enzima MUTYH, e a etapa seguinte de síntese pode incorporar a base correta. Se a adenina ainda não for removida, irá parear-se com T na próxima replicação do DNA, levando a transversão C:G para T:A. Já a enzima MTH1 hidrolisa nucleotídeos livres 8-OH-dGTP para formar monofosfatos. Quando um 8-OH-dGTP é erroneamente incorporado à fita oposta a A pela DNAPol, GO irá provocar a inserção de C

na próxima replicação do DNA, gerando transversões T:A para G:C (Bruner *et al.*, 2000; Nohmi *et al.*, 2005) (Figura 2).

Figura 2: Mecanismos de proteção contra 8-oxoG por meio das enzimas OGG1, MUTYH e MTH1 (Nohmi *et al.*, 2005).

Por ser uma das primeiras enzimas a atuar no reparo do DNA, a OGG1 é considerada uma peça fundamental no sistema de prevenção de danos oxidativos (Nohmi *et al.*, 2005). O gene humano *hOGG1* consiste em sete exons e está mapeado no *locus* 3p26.2, o qual aparece frequentemente deletado em várias formas de câncer (OMIM - NCBI). Vários polimorfismos no gene *hOGG1* já foram estudados, dentre os quais a mutação Ser326Cys foi relacionada a alguns tipos de cânceres, especialmente quando há influência de fatores ambientais (Weiss *et al.*, 2005).

1.4 Metabolismo da metionina: influências do gene *AHCY*, do folato e da vitamina B12 na carcinogênese

A metionina é um aminoácido essencial, cujo o metabolismo ocorre especialmente no fígado. Ela é responsável pela manutenção de dois importantes sistemas homeostáticos: a metilação celular e a neutralização antioxidante. Dessa forma, seu estudo é de grande interesse para a oncogenética (Martinov *et al.*, 2009).

O ciclo da metionina envolve a remetilação de homocisteína em metionina tanto pela reação da metionina sintetase (MS) dependente de folato (THF 5-CH₃) e vitamina B12, quanto pela reação da betaína-homocisteína-metiltransferase (BHMT) independente de folato e vitamina B12. Por meio da metionina-adenosiltransferase (MAT), a metionina é ativada para S-adenosilmetionina (SAM), a qual é a doadora de metila mais importante nas reações celulares mediadas por metiltransferases (MTase), incluindo a metilação de DNA, RNA, proteínas, fosfolipídeos, e neurotransmissores. Após a transferência do grupo metila, SAM é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH), que é metabolizada numa reação reversível à homocisteína e adenosina através da SAH hidrolase (SAHH). A adenosina pode ser fosforilada para formar nucleotídeos de adenosina pela adenosina quinase (AK), ou catabolizada para formar inosina pela adenosina desaminase (ADA). A homocisteína pode ser permanentemente removida do ciclo da metionina pela conversão irreversível em cistationina por meio da cistationinaβ-sintase (CBS) vitamina B6 dependente. Em seguida, a cistationina é então convertida em cisteína, que é o aminoácido essencial para a síntese do tripeptídeo glutathiona (Glu-Cys-Gly) (James *et al.*, 2004; Lu, 2009) (Figura 3).

Figura 3: Metabolismo da metionina no fígado, demonstrando o papel do folato, vitamina B12 e enzima SAHH na manutenção do ciclo. THF = tetrahydrofolato; THF 5-CH₃ = 5-metiltetrahydrofolato (Adaptado de James *et al.*, 2004).

Dessa forma, o decréscimo no *turnover* do ciclo da metionina pode acarretar em três importantes consequências: decréscimo na síntese de SAM, necessária para a atividade normal de metilação; decréscimo na síntese de cisteína e GSH, pois a diminuição na síntese de SAM também provoca diminuição na atividade da enzima CBS que converte homocisteína em cistationina (Lu, 2009; Martinov *et al.*, 2009); e acúmulo de homocisteína, levando a hiperhomocisteinemia e estresse oxidativo (Wu & Wu, 2002). Dada a importância do metabolismo da metionina, alterações que provocam distúrbios nesse sistema estão sendo associadas a diversas patologias como anemia (Selhub *et al.*, 2009), doenças neurodegenerativas (James *et al.*, 2004), doenças hepáticas (Mato *et al.*, 2008), anormalidades no desenvolvimento (Zhang *et al.*, 2008) e vários tipos de câncer (Davis & Uthus, 2004; Martinov *et al.*, 2009).

A respeito da carcinogênese, diversos fatores podem perturbar o metabolismo da metionina dentro da célula, dentre eles, deficiências nutricionais dos seus

principais co-fatores: folato e vitamina B12 (Baluz *et al.*, 2002; Stover, 2004). O estado nutricional de folato e vitamina B12 depende principalmente da disponibilidade nos alimentos, digestão e absorção (McNulty & Scott, 2008). Dessa forma, diversos estudos já relacionaram que o consumo de alimentos ricos em folato e vitamina B12 pode reduzir a incidência de alguns tipos de cânceres, inclusive CM (Sanjoaquin *et al.*, 2004; Maruti *et al.*, 2009; Galván-Portillo *et al.*, 2010).

Além dos fatores nutricionais, o desenvolvimento neoplásico envolvendo alterações no ciclo da metionina também pode estar relacionado a polimorfismos genéticos em enzimas importantes na formação da metionina intracelular, ou seja, enzimas também envolvidas na formação de SAM, homocisteína e GSH (Ma *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004; Semmler *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010). Dentre as alterações genéticas, já foi apontado que a baixa expressão do gene *AHCY* pode estar envolvida na carcinogênese de diversos tumores (Leal *et al.*, 2008). O gene *AHCY* codifica a enzima SAHH, e está localizado no locus 20cen-q13.1, possuindo 11 exons numa extensão de 23 kb. Alguns SNPs foram localizados em regiões codificantes do gene *AHCY*, dentre eles, o polimorfismo *AHCY* Arg38Trp parece atribuir baixa atividade para a enzima SAHH (Feng *et al.*, 2009), no entanto, o estudo desses SNPs em casos de câncer ainda foi pouco explorado.

1.5 Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo

Para avaliar a integridade do DNA em particular, o Ensaio Cometa (*single-cell gel electrophoresis*) e o Teste do Micronúcleo (*cytokinesis block micronucleus*) são bastante utilizados como biomarcadores. Dessa forma, tais biomarcadores podem ser definidos como indicadores de eventos celulares e moleculares em sistemas biológicos que podem estabelecer uma relação entre riscos ambientais, efeitos fisiológicos e patológicos humanos (Dusinska & Collins, 2008).

O Ensaio Cometa é um método simples, rápido e sensível para dosar quebras no DNA utilizando um pequeno número de células. Consiste em uma eletroforese com o DNA proveniente de células lisadas sobre uma lâmina de vidro em meio alcalino. A frequência de quebras no DNA determina a formação da “cauda do cometa” durante a migração induzida por uma eletroforese, que pode ser analisada por microscopia utilizando coloração adequada. Essas quebras incluem sítios apurínicos/apirimidínicos, os quais são frágeis em meio alcalino.

Recentemente, uma modificação na técnica com a incorporação de uma etapa extra de digestão com endonucleases específicas às lesões permite a detecção quantitativa de bases danificadas, principalmente bases oxidadas (Speit *et al.*, 2004; Dusinska & Collins, 2008).

A formação de micronúcleos (MN) é também bastante utilizada na epidemiologia molecular como biomarcador de danos cromossômicos e instabilidade genômica (Iarmarcovai *et al.*, 2005). Por definição, o MN é reconhecido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal que se forma durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. Desse modo, são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que se perderam do núcleo principal, representando perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou distúrbio no aparato mitótico. Portanto, somente em células que passaram por

um ciclo de divisão celular pode-se observar danos no DNA expressos na forma de micronúcleo (Fenech, 1997).

Uma importante vantagem proporcionada pelo Teste do MN é a possibilidade de quantificação da extensão e do progresso da divisão nuclear numa população de células em divisão, sendo esse parâmetro chamado de Índice de Divisão Nuclear (IDN). O IDN pode ser obtido por meio da contagem da frequência de células mononucleadas, binucleadas, e multinucleadas (com mais de dois núcleos) após um tempo determinado, seguido da adição de citocalasina B, que interrompe a divisão celular na telófase (Fenech, 1997).

Vários trabalhos relacionam polimorfismos genéticos à formação de MNs e também à detecção de quebras no DNA, tanto no monitoramento ambiental quanto nos estudos com câncer (Godderis *et al.*, 2004; Mateuca *et al.*, 2008; Synowiec *et al.*, 2010; Krupa *et al.*, 2011). Além disso, há alguns estudos caso-controle relacionando técnicas de biomonitoramento ao metabolismo da metionina e também a polimorfismos em genes envolvidos com o reparo de DNA (Duthie, 1999; Fenech, 2002; Loft & Møller, 2006; Wasson *et al.*, 2008). Em um estudo realizado com parentes femininos de primeiro grau (PFPG) de pacientes com CM, Rajeswari *et al.* (2000) observaram significativo aumento na frequência de MNs e nos danos ao DNA entre controles e PFPG, e também entre PFPG e as pacientes com CM, e sugeriram que o Teste do MN e o Ensaio Cometa podem servir como importantes biomarcadores de monitoramento populacional na avaliação de riscos individuais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Uma vez que existe a hipótese de que algumas lesões benignas mamárias podem ocasionar o aumento de risco para o desenvolvimento de CM, e que o estresse oxidativo é um importante fator na carcinogênese, o objetivo do presente trabalho foi determinar a frequência de polimorfismos genéticos envolvidos na produção de danos oxidativos; avaliar níveis sanguíneos de elementos bioquímicos importantes relacionados à proteção antioxidante; e também avaliar a extensão de lesões espontâneas no DNA utilizando técnicas citogenéticas de biomonitoramento em sangue periférico de voluntárias sadias, pacientes com lesões benignas (AE) e pacientes com lesões malignas de mama (CDI) não submetidas ao tratamento quimioterápico.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar a influência dos polimorfismos Ser326Cys do gene *hOGG1* e Arg38Trp do gene *AHCY* na susceptibilidade ao CM.
- ✓ Comparar o grau de danos espontâneos no DNA e nos cromossomos, e também os níveis sanguíneos de GSH-Px, folato e vitamina B12 entre grupos de mulheres sadias, pacientes com AE e pacientes com CDI não submetidas a tratamento quimio/radioterápico.
- ✓ Investigar a influência dos dois polimorfismos estudados e também dos níveis sanguíneos de GSH-Px, folato e vitamina B12, sobre a extensão dos danos oxidativos no DNA (Ensaio Cometa) e nos cromossomos (Teste do Micronúcleo) em linfócitos de sangue periférico de pacientes com AE, pacientes com CDI e controles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Neste estudo participaram pacientes do sexo feminino entre 30 a 60 anos de idade atendidas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP-USP), que foram diagnosticadas com câncer de mama de diferentes graus (CDI), e também pacientes apresentando tumor benigno (AE), além de voluntárias sadias livres de qualquer lesão mamária, sendo estas consideradas como grupo controle. As pacientes e voluntárias sadias foram selecionadas pela equipe médica do HCRP-USP, coordenada pelos Profs. Drs. Hélio H. A. Carrara e Jurandyr M. Andrade, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCRP-USP.

Todas as participantes do estudo foram entrevistadas a fim de serem informadas sobre os objetivos e metodologias desta pesquisa, e em seguida responderam a um questionário para coleta de informações a respeito de hábitos e fatores de risco (ver Anexos). Cada participante assinou um termo de consentimento autorizando o uso de seu sangue para o estudo. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (processo HCRP nº 8603/2009) (ver Anexos).

O sangue foi coletado em tubos numerados para manter o caráter confidencial das amostras e dos dados. Uma vez acabada a investigação, ou caso a doadora não aceite continuar participando da mesma, o material foi descartado.

As amostras foram analisadas em três aspectos: análise molecular (PCR-RFLP); análise citogenética (Frequência de MN, Índice de Divisão Nuclear e Ensaio Cometa) e análise bioquímica (dosagem de Glutathione Peroxidase, Folato e Vitamina B-12). A análise molecular foi realizada numa amostra total de 119 indivíduos: 10 pacientes com tumor benigno (média de idade: 51,2 anos), 54 pacientes com tumor maligno (média de idade: 49,5 anos) e 55 mulheres sadias (média de idade: 42,82 anos). As análises

bioquímica e citogenética foram realizadas numa sub-amostra de 45 indivíduos, escolhidos aleatoriamente dentre o número total de amostras: 10 pacientes com tumor benigno (média de idade: 51 anos), 14 pacientes com tumor maligno (média de idade: 49 anos) e 21 mulheres sadias (média de idade: 47 anos).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

O grupo de pacientes com tumor maligno se caracterizou por apresentar CDI em diferentes estadios clínicos, de acordo com exames patológicos e ultrassonográficos. Para o grupo de pacientes com tumor benigno foram selecionadas mulheres que, também de acordo com exames patológicos e ultrassonográficos, apresentaram fibroadenomas complexos contendo alterações do tipo AE. Já para o grupo controle foram selecionadas mulheres que não apresentaram evidências de lesões suspeitas nas mamas, de acordo com a triagem inicial feita por ultrassonografia.

Não foram selecionadas para este estudo pacientes e controles que apresentaram outros tipos de cânceres anteriormente, tampouco tenham recebido tratamento quimioterápico e/ou radioterápico em algum momento.

3.3 Avaliação molecular

3.3.1 Extração e quantificação de DNA genômico

Foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubos Vacutainer® com EDTA. A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit Wizard- Genomic DNA Purification® (Promega), seguindo instruções do fabricante. Em seguida, o DNA foi quantificado por espectrofotometria (GENEQuant®) e estocado na concentração de 100 ng/μL à -20°C até o uso.

3.3.2 Detecção do polimorfismo *hOGG1* Ser326Cys

A transversão de C para G na posição 1245pb no exon 7 do gene *hOGG1* foi detectada por meio da PCR-RFLP, segundo Jiao *et al.*, (2007) com algumas modificações. Primeiramente, fragmentos de 200 pb foram produzidos por PCR utilizando os primers:

F: 5' **ACTGTCACTAGTCTCACCAG** 3'

R: 5' **GGAAGGTGCTTGGGGAAT** 3'

Para cada reação foram necessários 10 mM de tampão, 5 mM de cada primer (Invitrogen), 3,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs (Invitrogen), 50 ng de DNA genômico e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Platinum® Taq - Invitrogen), gerando um volume de 25 µl. As condições de amplificação foram: denaturação inicial a 95°C por 10 min, seguindo 38 ciclos de 95°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min.

A transversão 1245C>G produz um novo sítio de restrição para a enzima Fnu4HI (**G**CCGC). Dessa forma, o produto da PCR de 200 pb foi digerido por 5U da enzima de restrição Fnu4HI (New England Biolabs®) *overnight*, formando dois fragmentos de 100 pb para o alelo 326Cys. Os fragmentos foram separados por eletroforese em agarose 2% e observados pela coloração com GelRed™. O homozigoto Cys/Cys foi clivado pela Fnu4HI, produzindo uma banda de 100 pb. O homozigoto Ser/Ser não pôde ser clivado pela Fnu4HI, permanecendo a banda de 200 pb. O heterozigoto Ser/Cys produziu as duas bandas de 100 pb e 200 pb. Em todas as etapas foram inseridos controles negativos.

3.3.3 Detecção do polimorfismo *AHCY* Arg38Trp

A transição de C para T na posição 112 pb no exon 2 do gene *AHCY* foi detectada por meio da PCR-RFLP, segundo Gellekink *et al.* (2004) com algumas

modificações. Primeiramente, os fragmentos de 338 pb foram produzidos por PCR utilizando os primers:

F: 5' **GTGACCGCCCCTCTTGGTTGG** 3'

R: 5' **CCACCCTGGCACAGTCGTCTTC** 3'

Para cada reação foram necessários 0,1 mM de dNTPs (Invitrogen), 10mM de tampão, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 U de Taq DNA Polimerase (Platinum® Taq – Invitrogen), DMSO 5%, 50 ng de DNA genômico e 3,5 mM dos primers (Invitrogen), gerando um volume de 25 µl. As condições de amplificação foram: denaturação inicial a 94°C por 4 min, 32 ciclos de 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 7 min.

A transição 112C>T elimina um sítio de restrição da enzima BsrB1 (GAGCGG). Dessa forma, o produto da PCR de 338 pb, foi digerido por 5U da enzima de restrição BsrB1 (New England Biolabs®) a 37°C *overnight*, e em seguida separado por eletroforese em agarose 2% e foi observado pela coloração com GelRed™. O homozigoto Arg/Arg foi clivado pela BsrB1, produzindo duas bandas com 149 pb e 189 pb. O homozigoto Trp/Trp não é clivado e produz apenas uma banda com 338 pb. O heterozigoto Arg/Trp apresentou as três bandas com 149, 189 e 338 pb. Em todas as etapas foram inseridos controles negativos.

3.4 Avaliação citogenética

3.4.1a Citocalasina B (Cit-B)

A citocalasina B (C₂₉H₃₇NO₅ – CAS: 14930-96-2, Sigma) foi diluída em dimetilsufóxido (DMSO – CAS: 67-68-5, Sigma), a fim de se obter uma solução de uso (1 µg/µL) que foi mantida a 4°C protegida da luz. Para os experimentos a Cit-B foi utilizada na concentração final de 5 µg/µL de meio de cultura.

3.4.1b Teste do Micronúcleo

Foram feitas culturas de linfócitos do sangue periférico coletado em tubos Vacutainer® (10 mL), contendo heparina sódica. Após sedimentação espontânea foram obtidos o plasma com a camada de linfócitos, e aproximadamente 1,5 mL dessa mistura foi semeada em 5 mL meio de cultura completo constituído de 78% de meio RPMI 1640 (Sigma), 20% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e 2% de fitohemaglutinina A (Gibco). As culturas foram mantidas por um tempo total de 72 horas em estufa a 37°C. Para a obtenção de células binucleadas foram adicionados às culturas 5 µg/mL de Cit-B (Sigma), após 44h de cultivo.

A obtenção de células binucleadas seguiu a metodologia proposta por Fenech & Morley (1985), com pequenas modificações. Após 28 h de incubação com Cit-B as culturas foram centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos e o sedimento celular foi cuidadosamente ressuspensionado em 3 mL de solução hipotônica de citrato de sódio (1%) a 4°C. Em seguida foram acrescentados 3 mL de fixador a 4°C (3 partes de metanol : 1 parte de ácido acético) e 5 gotas de formaldeído (37%). O material foi centrifugado a 1000 r.p.m. por 5 minutos e ressuspensionado em 5 mL de fixador a 4°C por mais duas vezes sendo que na última etapa as células foram ressuspensionadas em 0,5 mL de fixador. Para a confecção das lâminas foram gotejadas 2 a 3 gotas de suspensão celular em lâminas previamente limpas que foram armazenadas em água destilada gelada. As lâminas foram secas à temperatura ambiente para posterior coloração.

A coloração foi feita usando-se solução de Giemsa diluído em tampão Sörensen (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06M; pH 6,8) na proporção 1:20 por 5 minutos, quando então as lâminas foram enxaguadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e armazenadas até o momento da análise.

A análise das lâminas foi feita em microscópio de luz de transmissão ZEISS (Germany) com aumento de 400x. Foram contabilizadas 1000 células binucleadas/indivíduo com citoplasma íntegro e núcleos principais nitidamente delimitados.

Foram considerados como MN as formações com tamanho entre 1/16 e 1/3 dos núcleos principais, com coloração semelhante à coloração dos núcleos principais, sem emissão de refração e sem sobreposição a qualquer um dos núcleos principais.

3.4.1c Índice de Divisão Nuclear

O Teste do Micronúcleo permite também a determinação do Índice de Divisão Nuclear (IDN). Para isso, foi considerada a frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos numa população de 1000 células analisadas por indivíduo, também utilizando microscópio de luz de transmissão ZEISS (Germany) com aumento de 400x.

O IDN foi calculado de acordo com Eastmond & Tucker (1989) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N \quad \text{onde,}$$

M1 – M4: número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente

N: número total de células viáveis.

3.4.2a Ensaio Cometa Alcalino

Foi utilizada a versão alcalina do Ensaio Cometa segundo a metodologia descrita por Singh *et al.* (1988) que consiste em ressuspender 5 µL de sangue total em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Essa mistura homogênea foi depositada cuidadosamente sobre uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). O material foi coberto com uma lamínula (24 x 60 mm) e deixado a 4°C por 5 minutos. Retirou-se a lamínula delicadamente e mergulhou-se as lâminas em uma solução de lise a 4°C (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por pelo menos duas horas. As lâminas foram então incubadas em um tampão de pH alcalino (NaOH 0,3 M e Na₂EDTA 1 mM, pH > 13) durante 20 minutos e posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese horizontal contendo

o mesmo tampão também a 4°C, onde se aplicou por 20 minutos uma corrente elétrica de 25V e 300mA. Ao final, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, secas à temperatura ambiente e fixadas etanol absoluto por 3 minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata e armazenadas até o momento da análise.

Finalmente, as lâminas foram coradas com Sybr Green[®], e analisadas em microscópio de epi-fluorescência (ZEISS, filtro 516-560 nm e barreira de filtro de 590 nm), em aumento de 40x. Foram analisados 100 nucleóides/indivíduo, sendo incluídos na análise os nucleóides com contorno circular (núcleos sem danos de DNA) ou com forma de “cometa” (núcleos com danos no DNA), na qual a extensão da cauda reflete a distância de migração do DNA danificado.

De acordo com Speit (1995), as células são classificadas conforme o comprimento da cauda em cinco categorias que correspondem às seguintes quantidades de danos no DNA:

- 0 = sem danos (<5%)
- 1 = baixo nível de danos (5-20%)
- 2 = médio nível de danos (20-40%)
- 3 = alto nível de danos (40-95%)
- 4 = totalmente danificado (>95%)

Para análise dos danos no DNA, foi calculado o escore de danos para cada indivíduo. O escore foi calculado da seguinte maneira:

- Número de células classe 0 x 0
- Número de células classe 1 x 1
- Número de células classe 2 x 2
- Número de células classe 3 x 3
- Número de células classe 4 x 4

Em que:

$\text{Escore de dano} = \sum \text{valores de cada classe} / n^{\circ} \text{ de células analisadas}$
--

3.4.2b Ensaio Cometa para detecção de danos oxidativos

O Ensaio Cometa permite a adequação de algumas etapas intermediárias que aumentam a especificidade do tipo de lesão no DNA a ser detectada. Para isso, é necessária incubação com uma endonuclease de reparo lesão-específica que permite a expressão de danos específicos de bases na forma de quebras de fita simples. A endonuclease utilizada neste estudo foi a OGG1, enzima específica para detecção de dano oxidativo causado por 8-oxoG (Smith *et al.*, 2006).

Desse modo, após a etapa de lise descrita no *item 3.4.2a*, as duplicatas das lâminas foram lavadas uma vez (5 minutos) em solução de PBS 1X, e em seguida duas vezes (5 minutos cada) em tampão de reação de enzimas (40 mM HEPES-KOH; 0,1 mM KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/mL BSA; pH 8,0). Sobre cada lâmina foram depositados 30 µL (0,8 U) de enzima OGG1 (New England Biolabs®). As lâminas foram cobertas com lamínulas (24 x 60mm) e incubadas a 37°C por 20 minutos em câmara úmida (Vysis® HYBrite™). Em seguida, procedeu-se as etapas de eletroforese, neutralização, fixação e análise conforme descrito no *item 3.4.2a*.

A quantidade de dano oxidativo é dada pela subtração dos escores de danos obtidos no cometa com enzima (+OGG1) e sem a enzima (-OGG1):

$$\text{Dano Oxidativo} = (\text{escore de dano com OGG1}) - (\text{escore de dano sem OGG1})$$

3.5 Avaliação Bioquímica

3.5.1 Separação de plasma e concentrado eritrocitário

Foram coletados de cada voluntária, em jejum de no mínimo 5 horas, 10 ml de sangue venoso utilizando tubos Vacutainer® heparinizados e com EDTA. Foi realizada a separação de plasma e concentrado de hemácias por meio de centrifugação 17000 r.p.m.

por 15 minutos. Em seguida, o concentrado de hemácias foi lavado 2 vezes em salina 0,9%. Plasma e concentrado de hemácias foram estocados a -20°C até o momento da análise.

3.5.2 Ácido fólico e vitamina B12 no plasma

Os níveis de ácido fólico e vitamina B12 no plasma heparinizado foram determinados por imunoensaios de competição (kits Immulite®) e a quantificação foi realizada pela medição da quimiluminescência amplificada usando um analisador Immulite 1000® (Siemens), seguindo procedimentos recomendados pelo fabricante (Babson *et al.*, 1991). Os resultados para folato e vitamina B12 são expressos em ng/mL e pg/mL, respectivamente.

3.5.3 Glutathione Peroxidase em hemolisado eritrocitário

Numa primeira etapa foi determinada a quantidade de hemoglobina presente nos respectivos hemolisados (kit Labtest®) seguindo procedimentos do fabricante.

A detecção de GSH-Px nas amostras foi baseada no método descrito por Flohé & Günzler (1984), em que é estimado o consumo de NADPH na reação e a consequente queda na absorbância após 5 minutos da adição de t-butil-hidroperóxido (TBH). A GSH-Px dismuta o TBH do ensaio e produz uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-GS). Esta volta ao estado reduzido (2 GSH) pela ação da glutathione redutase (GSH-Rd). A GSH-Rd age mediante a oxidação de NADPH.

Desse modo, a técnica consistiu em adicionar 50 µL do sedimento eritrocitário diluído para 2,5 g Hb/dL a 1,9 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). Na sequência foram adicionados 0,5 mL de GSH (1,0 mM), 0,5 mL de NADPH (0,2 mM) e GSH-Rd (1 U). A mistura foi incubada por 5 minutos a 37°C. Foram adicionados em seguida 50 µL de TBH (1,0 mM) e a solução foi homogeneizada por inversão. Finalmente foi feita a leitura em espectrofotômetro (Beckman®), a 340 nm e 37°C. Para o resultado foi considerado para

o NADPH um coeficiente de extinção de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade de 1 U de GSH-Px foi calculada como um μmol de NADPH consumido por minuto, por grama de hemoglobina ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ou U/g Hb)

3.6 Análise estatística

Para verificar a significância estatística das associações entre frequências dos genótipos na amostra total de CDI, AE e controles, foram aplicados o Teste Exato de Fisher – bi-caudal (Agresti, 1992) e o Teste Qui-Quadrado (χ^2). Nesta análise estatística foram considerados os dados clínicos, citogenéticos e moleculares, tendo como critério de significância um nível de probabilidade (P) menor ou igual a 0,05. As razões de probabilidade (OR : *odds ratio*) e o intervalo de confiança (IC) de 95% (Kleinbaum *et al.*, 1982) foram calculados como uma estimativa de risco relativo e grau de associação das pacientes (CDI e AE) em relação ao grupo controle.

Os resultados obtidos nos experimentos citogenéticos (Frequência de MNs, Índice de Divisão Nuclear, Ensaio Cometa) e bioquímicos (dosagens de folato, vitamina B12 e GSH-Px) para a sub-amostra de pacientes com CDI, AE e controles foram analisados através do teste de Análise de Variância (ANOVA), Teste de Tukey, e Teste de Dunnet, sendo as razões de probabilidade calculadas com IC de 95%.

Por fim, para determinar o grau de correlação e dependência entre os resultados bioquímicos e citogenéticos foram empregadas a Correlação Linear de *Pearson* (r) e a Regressão Linear Simples, também calculadas com IC de 95%. Todas as análises foram realizadas por meio do software BioEstat versão 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

4. RESULTADOS

4.1 Análise Molecular: genes *hOGG1* e *AHCY*

São apresentados a seguir os dados referentes ao estudo dos polimorfismos Ser326Cys no gene *hOGG1* e Arg38Trp no gene *AHCY* no número total de amostras de pacientes com CDI (n =54), pacientes com AE (n =10) e mulheres sadias (n=55).

4.1.1 Caracterização geral da amostra total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias utilizadas na análise molecular

A caracterização da amostra total de participantes quanto à idade, hábito tabagista, consumo de bebida alcoólica, idade da menarca, menopausa, uso de hormônios (contraceptivos ou terapia de reposição hormonal), idade da primeira gestação, ocorrência de abortos espontâneos e existência de familiares com câncer está apresentada na Tabela 1.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com CDI em relação a controles (P_1), pacientes com AE em relação a controles (P_2) e pacientes com CDI em relação a pacientes com AE (P_3) para todos os parâmetros estudados.

Quanto à faixa etária, ambos os grupos de pacientes com CDI (61,1%) e AE (80%) apresentam-se, em sua maioria, idade superior a 45 anos de idade. Foi observado tanto em pacientes (CDI e AE), quanto em mulheres sadias, que a maioria não faz uso de álcool e/ou fumo.

Para os três grupos, foi observado que a menarca ocorre com maior frequência até os 13 anos de idade, principalmente em mulheres controle (72,7%). Além

disso, a maioria das pacientes com CDI (50%) e mulheres controle (67,3%) encontra-se na pré-menopausa.

Quanto ao uso de hormônios, observa-se prevalência para o uso de contraceptivos orais, tanto em pacientes com CDI (59,3%), quanto em controles (67,3%).

A maioria das pacientes com CDI (83,3%), AE (80%) e controles (85,4%) teve sua primeira gestação antes dos 30 anos. Além disso, a maioria das pacientes com CDI (63%) e das mulheres controle (69,1%) nunca sofreu aborto, enquanto 50% das pacientes com AE apresentou pelo menos um aborto.

Por fim, a maioria das pacientes com CDI (59,3%) e das mulheres controle (54,6%) relataram não possuir familiares com história de câncer. Por outro lado, houve maior frequência de indivíduos com história de câncer na família entre as pacientes com AE (70%).

Tabela 1. Caracterização do grupo total de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias quanto à idade, hábito tabagista, consumo de álcool, idade da menarca, menopausa, uso de hormônios, idade da primeira gestação, ocorrência de abortos e histórico familiar de câncer, utilizadas para o estudo dos polimorfismos dos genes *hOGG1* e *AHCY*.

Fator	Pacientes CDI (n=54)		Pacientes AE (n=10)		Controles (n=55)		<i>P</i> ₁	<i>P</i> ₂	<i>P</i> ₃
	n	%	n	%	n	%			
Idade									
≤ 45 anos	21	38,9	2	20,0	30	54,5	0,12	0,17	0,30
> 45 anos	33	61,1	8	80,0	25	45,5			
Tabagismo									
Fumantes	22	40,7	4	40,0	20	36,4	0,69	0,99	1,00
Não-Fumantes	32	52,3	6	60,0	35	63,6			
Consumo de Alcool									
Sim	24	44,4	4	40,0	17	30,9	0,16	0,71	1,00
Não	30	55,6	6	60,0	38	69,1			
Menarca									
≤ 13 anos	34	63,0	6	60,0	40	72,7	0,30	0,46	0,99
> 13 anos	20	37,0	4	40,0	15	27,3			
Menopausa									
Pré-Menopausa	27	50,0	4	40,0	37	67,3	0,04	0,41	1,00
Pós-Menopausa	25	46,3	4	40,0	15	27,3			
NI ou NEC	2	3,7	2	20,0	3	5,4			
Uso de Hormônios									
Contraceptivo oral									
Sim	32	59,3	5	50,0	37	67,3	0,43	0,47	0,73
Não	22	40,7	5	50,0	18	32,7			
Terapia de reposição									
Sim	9	16,7	2	20,0	2	3,6	0,02	0,10	0,99
Não	45	83,3	8	80,0	53	96,4			
Idade da 1ª gestação									
≤ 30 anos	45	83,3	8	80,0	47	85,4	0,17	0,02	0,44
> 30 anos	5	9,3	2	20,0	1	1,8			
Nuligesta	4	7,4	0	0,0	7	12,8			
Ocorrência de abortos									
Sim	20	37,0	5	50,0	17	30,9	0,54	0,28	0,49
Não	34	63,0	5	50,0	38	69,1			
Familiares com câncer									
Sim	22	40,7	7	70,0	25	45,4	0,70	0,18	0,16
Não	32	59,3	3	30,0	30	54,6			

P: Teste do χ^2 com $\alpha=0,05$ e Teste Exato de Fisher com $\alpha=0,01$;

NI: não informado; NEC: não se enquadra no critério.

1: CDI em relação ao controle;

2: AE em relação ao controle;

3: CDI em relação à AE.

4.1.2 Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos nos genes *hOGG1* e *AHCY* na amostra total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias

A distribuição das frequências genóticas e alélicas para os polimorfismos Ser326Cys *hOGG1* (C>G) e Arg38Trp *AHCY* (C>T) na amostra total de participantes está apresentada na Tabela 2.

Para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1*, foi observado que o genótipo homozigoto polimórfico (GG) está presente em 5,5% das pacientes com CDI, 10% das pacientes com AE e 1,8% das mulheres sadias, e o genótipo homozigoto mais frequente (CC) foi encontrado em 66,7% das pacientes com CDI, 70% das pacientes com AE, e 60% das mulheres sadias. As frequências genóticas e alélicas para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* não diferiram significativamente entre os três grupos de estudo.

Em relação ao polimorfismo Arg38Trp *AHCY*, não foram observados indivíduos homozigotos para o alelo polimórfico (TT) nos três grupos estudados. No entanto, foi observado um único indivíduo heterozigoto (CT) no grupo de pacientes com CDI (1,9%) e controle (1,8%). Além disso, foram observados apenas indivíduos homozigotos (CC) no grupo de pacientes com AE. Dessa forma, as frequências genóticas e alélicas para o polimorfismo Arg38Trp *AHCY* também não diferiram significativamente entre os grupos de pacientes com CDI e controles entre os três grupos de estudo. Devido ao número insuficiente de indivíduos portadores do alelo polimórfico (T), o gene *AHCY* não foi submetido às demais avaliações neste trabalho.

Tabela 2. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *hOGG1* e *AHCY* no grupo total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias.

Locus	Genótipo	Número/Total (%)			OR ₁ (95% IC)	OR ₂ (95% IC)	P ₁	P ₂
		Pacientes CDI (n=54)	Pacientes AE (n=10)	Controles (n=55)				
<i>hOGG1</i>	CC	36/54(66,7)	7/10 (70)	33/55 (60)	1,0 (referência)	1,0 (referência)	-	-
	CG	15/54(27,8)	2/10 (20)	21/55 (38,2)	1,52 (0,68-3,44)	2,23 (0,42-11,76)	0,41	0,56
	GG	3/54 (5,5)	1/10 (10)	1/55 (1,8)	0,36 (0,04-3,67)	0,21 (-)	0,71	0,82
	CG + GG	18/54 (33,3)	3/10 (30)	22/55 (44)	1,33 (0,61-2,91)	1.56 (0,36-6,67)	0,60	0,81
	Alelos (Frequência)							
	C	0,80	0,80	0,79	1,06 (0,53-2,11)	1,06 (0,53-2,11)	1,00	1,00
	G	0,20	0,20	0,21				
<i>AHCY</i>	CC	53/54 (98)	10 (100)	54/55 (98,2)	1,0 (referência)	1,0 (referência)	-	-
	CT	1/54 (1,9)	-	1/55 (1,8)	0,98 (-)	-	0,48	-
	TT	-	-	-	-	-	-	-
	CT + TT	1/54 (1,9)	-	1/55 (1,8)	0,98 (-)	-	0,48	-
	Alelos (Frequência)							
	C	0,99	1,0	0,99	-	-	-	-
	T	0,01	-	0,01				

P: Teste Exato de Fisher com $\alpha=0,01$; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; 1: CDI em relação ao controle; 2: AE em relação ao controle.

4.1.3 Distribuição dos genótipos referentes ao polimorfismo no gene *hOGG1* na amostra total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias fumantes e/ou consumidoras de álcool

A distribuição das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* (C>G) na amostra total de pacientes com CDI (n=35), pacientes com AE (n=5) e mulheres controle (n=29) fumantes e/ou consumidoras de álcool está apresentada na Tabela 3.

Foi observado que as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* não diferiram significativamente entre os três grupos de estudo.

Verificou-se que a frequência de indivíduos homozigotos polimórficos (GG) foi maior em pacientes com CDI (5,8%) em relação aos controles (3,5%), porém, não foram encontrados indivíduos com genótipo GG no grupo de pacientes com AE.

No entanto, a soma de indivíduos heterozigotos e homozigotos polimórficos (CG+GG) foi maior no grupo controle (41,3%), em relação às pacientes com AE (40%) e pacientes com CDI (34,5%).

Tabela 3. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo do gene *hOGG1* no grupo total de pacientes com CDI, pacientes com AE e mulheres sadias fumantes e/ou consumidoras de álcool.

Locus	Genótipo	Número/Total (%)			OR ₁ (95% IC)	OR ₂ (95% IC)	P ₁	P ₂
		Pacientes CDI (n=35)	Pacientes AE (n=5)	Controles (n=29)				
<i>hOGG1</i>	CC	23/35 (65,7)	3/5 (60)	17/29 (58,6)	1,0 (referência)	1,0 (referência)	-	-
	CG	10/35 (28,5)	2/5 (40)	11/29 (37,9)	1,49 (0,51-4,30)	0,97 (0,14-6,78)	0,64	0,64
	GG	2/35 (5,8)	-	1/29 (3,5)	0,68 (-)	-	0,77	-
	CG + GG	12/35 (34,5)	2/5 (40)	12/29 (41,3)	1,35 (0,49-3,74)	1,05 (0,15-7,33)	0,74	0,66
Alelos (Frequência)								
	C	0,80	0,80	0,77	1,19 (0,60- 2,34)	1,19 (0,60- 2,34)	0,73	0,73
	G	0,20	0,20	0,23				

P: Teste Exato de Fisher com $\alpha=0,01$; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; 1: CDI em relação ao controle; 2: AE em relação ao controle.

4.1.4 Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos dos genes *hOGG1* na amostra total de pacientes com CDI de acordo com características anatomopatológicas

Foram realizadas análises dos genótipos encontrados para os polimorfismos Ser326Cys *hOGG1* em relação às características histológicas determinadas por exames anatomopatológicos de cada paciente, com a finalidade de verificar se há alguma associação genética para esses parâmetros (Tabela 4).

Como resultado, não foram observadas diferenças significativas em relação aos genótipos do polimorfismo Ser326Cys *hOGG1*, revelando não haver associação entre a presença/ausência do alelo polimórfico e as características tumorais nesta amostra de estudo.

Com relação à idade, foi observado que 51,8% dos indivíduos possuíam idade menor ou igual a 50 anos e que 48,2% possuíam idade maior que 50 anos. Além disso, a maioria das pacientes estudadas está na pré-menopausa (50%).

O grau histológico dos tumores segue a classificação Scarff-Bloom-Richardson (Bloom & Richardson, 1957), modificada por Elston & Ellis (1991), que determina o grau de diferenciação das células neoplásicas considerando a formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. Dessa forma, quanto maior o grau, mais diferenciado é o tumor, ou seja, mais agressivo ele se torna. Neste estudo, o grau II foi o mais frequente (50%), seguido pelo grau III (25,9%), e grau I (16,7%).

Foi observado que 63% das amostras foram positivas para o receptor estrógeno, 44,4% foram positivas para o receptor progesterona, e 31,5% foram positivas para a expressão da proteína erbB2.

Tabela 4. Caracterização do grupo total de pacientes com CDI (n=54), agrupadas de acordo com os genótipos referentes ao polimorfismo Ser326Cys *hOGG1*, quanto às características anatomopatológicas.

Variável	n	%	CC (%)	CG (%)	GG (%)	P
Idade						
≤ 50 anos	28	51,8	21 (75,0)	6 (21,4)	1 (3,6)	0,39
> 50 anos	26	48,2	15 (57,7)	9 (34,6)	2 (7,7)	
Grau Histopatológico						
I	9	16,7	4 (44,5)	4 (44,4)	1 (11,1)	0,63
II	27	50,0	19 (70,4)	7 (25,9)	1 (3,7)	
III	14	25,9	10 (71,5)	3 (21,4)	1 (7,1)	
Não determinado	4	7,4	-	-	-	
Menopausa						
Pré-Menopausa	27	50,0	20 (74,1)	5 (18,5)	2 (7,4)	0,35
Pós-Menopausa	25	46,3	15 (60,0)	9 (36,0)	1 (4,0)	
NI ou NEC	2	3,7	-	-	-	
Receptor de estrógeno						
Positivo	34	63,0	25 (73,6)	8 (23,5)	1 (2,9)	0,24
Negativo	19	35,2	10 (52,7)	7 (36,8)	2 (10,5)	
Não determinado	1	1,8	-	-	-	
Receptor de progesterona						
Positivo	24	44,4	18 (75,0)	6 (25,0)	0	0,18
Negativo	28	51,9	16 (57,2)	9 (32,1)	3 (10,7)	
Não determinado	2	3,7	-	-	-	
erbB2						
Positivo	17	31,5	11 (64,7)	5 (29,4)	1 (5,9)	0,99
Negativo	33	61,1	22 (66,6)	9 (27,3)	2 (6,1)	
Não determinado	4	7,4	-	-	-	

P: Teste do χ^2 com $\alpha=0,05$; NI: não informado; NEC: não se enquadra no critério

4.2 Análises bioquímicas (folato, vitamina B12 e GSH-Px) e citogenéticas (MN, IDN e Ensaio cometa)

São apresentados a seguir os dados referentes ao estudo bioquímico (dosagens de folato, vitamina B12 e GSH-Px) e citogenético (Frequência de MN, IDN e Ensaio Cometa) realizado na sub-amostra de pacientes com CDI (n=14), AE (n=10) e mulheres sadias (n=21).

4.2.1 Caracterização geral da sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias utilizadas na análise bioquímica e citogenética

A caracterização da sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres controle quanto à idade, hábito tabagista, consumo de bebidas alcoólicas, idade da menarca, menopausa, uso de hormônios (contraceptivos ou terapia de reposição hormonal), idade da primeira gestação, ocorrência de abortos espontâneos e existência de familiares com câncer está apresentada na Tabela 5.

Foi verificado para os três sub-grupos deste estudo que a maioria das participantes: possuem idade maior que 45 anos, nunca fumaram, não consomem bebidas alcoólicas, apresentaram menarca antes dos 13 anos de idade, nunca fizeram terapia para reposição hormonal, tiveram sua 1ª gestação antes dos 30 anos e possuem familiares com algum tipo de câncer.

Para todos os parâmetros analisados na Tabela 5, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os três sub-grupos estudados.

Tabela 5. Caracterização da sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias quanto à idade, hábito tabagista, consumo de álcool, idade da menarca, idade da menopausa, uso de hormônios, idade da primeira gestação, ocorrência de abortos e histórico familiar de câncer, utilizadas nas análises bioquímica e citogenética.

Fator	Pacientes CDI n=(14)		Pacientes AE (n=10)		Controle (n=21)		P ₁	P ₂
	n	%	n	%	n	%		
Idade								
≤ 45 anos	6	42,9	2	20,0	8	38,1	1,00	0,42
> 45 anos	8	57,1	8	80,0	13	61,9		
Tabagismo								
Fumantes	4	28,6	4	40,0	4	19,0	0,67	0,38
Não-Fumantes	10	71,4	6	60,0	17	81,0		
Consumo de Alcool								
Sim	3	21,4	4	40,0	3	14,3	0,66	0,17
Não	11	78,6	6	60,0	18	85,7		
Menarca								
≤ 13 anos	10	71,4	6	60,0	16	76,2	1,00	0,42
> 13 anos	4	28,6	4	40,0	5	23,8		
Menopausa								
Pré-Menopausa	7	50,0	4	40,0	10	47,6	0,99	0,98
Pós-Menopausa	5	35,7	4	40,0	8	38,1		
NI ou NEC	2	14,3	2	20,0	3	14,3		
Uso de Hormônios								
Contraceptivo oral								
Sim	7	50,0	5	50,0	14	66,7	0,48	0,45
Não	7	50,0	5	50,0	7	33,3		
Terapia de reposição								
Sim	1	7,1	2	20,0	1	4,8	1,00	0,24
Não	15	92,9	8	80,0	20	95,2		
Idade da 1ª gestação								
≤ 30 anos	14	100	8	80,0	21	100	1,00	0,09
> 30 anos	0	-	2	20,0	0	-		
Nuligesta	0	-	0	0,0	0	-		
Abortos								
Sim	8	57,1	5	50,0	10	47,6	0,73	1,00
Não	6	42,9	5	50,0	11	52,4		
Familiares c/ câncer								
Sim	10	71,4	7	70,0	13	61,9	0,72	0,71
Não	4	28,6	3	30,0	8	38,1		

P: Teste do χ^2 com $\alpha=0,05$ e Teste Exato de Fisher com $\alpha=0,01$; NI: não informado; NEC: não se enquadra no critério; 1: CDI em relação ao controle; 2: AE em relação ao controle.

4.2.2 Análise das dosagens de folato, vitamina B12 e GSH-Px na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias

A análise dos níveis plasmáticos de folato (ng/mL) e vitamina B12 (pg/mL), determinados por imunoensaios de competição (Immulite[®]), e dos níveis eritrocitários de GSH-Px (U/g Hb) utilizando TBH como substrato da reação, na sub-amostra de pacientes com CDI (n=14), AE (n=10) e mulheres sadias (n=21), pode ser observada nas Tabelas 6 e 7, divididas em relação à idade (≤ 45 anos e > 45 anos).

Na análise dos três grupos separadamente, comparando as duas faixas etárias, foi observado que o aumento da idade interfere somente no grupo de pacientes com CDI, onde mulheres até 45 anos apresentam, em média, níveis sanguíneos de folato significativamente maiores do que mulheres com idade acima de 45 anos ($P < 0,05$). Por outro lado, os valores médios das dosagens de vitamina B12 e GSH-Px não diferiram significativamente em relação à faixa etária nos três grupos estudados (Tabela 6).

Analisando indivíduos acima dos 45 anos, foi verificado que pacientes com CDI apresentam, em média, níveis sanguíneos de GSH-Px significativamente maiores do que o grupo controle ($P_1 < 0,01$) (Tabela 7). Adicionalmente, foi observado que pacientes com CDI também apresentam níveis de GSH-Px significativamente maiores do que o grupo de pacientes com AE ($P_3 < 0,05$) (Dado não apresentado em tabela).

Tabela 6. Valores médios $\pm$ Desvio Padrão dos níveis de folato, vitamina B-12 e GSH-Px dosados no sangue periférico da sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias de acordo com a idade (≤ 45 anos e > 45 anos).

Bioquímica	Pacientes com CDI (X $\pm$ DP)		P
	≤ 45 anos (n=6)	> 45 anos (n=8)	
Folato (ng/mL)	8,73 $\pm$ 1,84	5,41 $\pm$ 2,66	<0,05*
Vitamina B-12 (pg/mL)	468,5 $\pm$ 211,5	442,5 $\pm$ 165,7	0,79
GSH-Px (U/g Hb)	44,72 $\pm$ 4,95	47,92 $\pm$ 4,16	0,21
Bioquímica	Pacientes com AE (X $\pm$ DP)		P
	≤ 45 anos (n=2)	> 45 anos (n=8)	
Folato (ng/mL)	6,75 $\pm$ 1,06	7,04 $\pm$ 1,68	0,82
Vitamina B-12 (pg/mL)	685,5 $\pm$ 183,1	438,1 $\pm$ 174,6	0,11
GSH-Px (U/g Hb)	33,36 $\pm$ 6,8	39,6 $\pm$ 6,83	0,28
Bioquímica	Controle (X $\pm$ DP)		P
	≤ 45 anos (n=8)	> 45 anos (n=13)	
Folato (ng/mL)	6,04 $\pm$ 3,05	6,58 $\pm$ 3,31	0,71
Vitamina B-12 (pg/mL)	407,2 $\pm$ 265,2	443,4 $\pm$ 231,5	0,74
GSH-Px (U/g Hb)	41,13 $\pm$ 8,54	37,87 $\pm$ 6,32	0,33

P: Teste ANOVA com $\alpha=0,05$ e Teste de Tukey com $\alpha=0,01$; X $\pm$ DP: Média $\pm$ Desvio Padrão; *: estatisticamente significativo

Tabela 7. Valores médios $\pm$ Desvio Padrão dos níveis de folato, vitamina B-12 e GSH-Px dosados no sangue periférico da sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias divididas em relação à idade (≤ 45 anos e > 45 anos).

Bioquímica	≤ 45 anos (X $\pm$ DP)			P ₁	P ₂
	CDI (n=6)	AE (n=2)	Controle (n=8)		
Folato (ng/mL)	8,73 $\pm$ 1,84	6,75 $\pm$ 1,06	6,04 $\pm$ 3,05	0,08	0,76
Vitamina B-12 (pg/mL)	468,5 $\pm$ 211,5	685,5 $\pm$ 183,1	407,2 $\pm$ 265,2	0,65	0,21
GSH-Px (U/g Hb)	44,72 $\pm$ 4,95	33,36 $\pm$ 6,8	41,13 $\pm$ 8,54	0,62	0,27
Bioquímica	> 45 anos (X $\pm$ DP)			P ₁	P ₂
	CDI (n=8)	AE (n=8)	Controle (n=13)		
Folato (ng/mL)	5,41 $\pm$ 2,66	7,04 $\pm$ 1,68	6,58 $\pm$ 3,31	0,59	0,72
Vitamina B-12 (pg/mL)	442,5 $\pm$ 165,7	438,1 $\pm$ 174,6	443,4 $\pm$ 231,5	0,99	0,96
GSH-Px (U/g Hb)	47,92 $\pm$ 4,16	39,6 $\pm$ 6,83	37,87 $\pm$ 6,32	<0,01*	0,56

P: Teste ANOVA com $\alpha=0,05$ e Teste de Tukey com $\alpha=0,01$;

X $\pm$ DP: Média $\pm$ Desvio Padrão;

*: estatisticamente significativo;

1: CDI em relação ao controle;

2: AE em relação ao controle

4.2.3 Análise da eficiência da enzima OGG1 em detectar danos oxidativos pelo Ensaio Cometa

Para o Ensaio Cometa, primeiramente foi analisado o desempenho da enzima OGG1 em detectar danos oxidativos nos três sub-grupos estudados de pacientes com CDI, AE e controles, utilizando a comparação entre os valores médios do escore de dano sem enzima (-OGG1) e escore de dano com enzima (+OGG1) obtidos para cada sub-grupo (Tabela 8).

Foi verificado que a enzima OGG1 apresentou eficiência estatisticamente significativa para os três sub-grupos estudados: CDI ($P = 0,0003$), AE ($P = 0,03$) e controles ($P < 0,0001$) (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios $\pm$ Desvio Padrão de escore de danos sem enzima (-OGG1) e com enzima (+OGG1), detectados pelo Ensaio Cometa em linfócitos de sangue periférico na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres saudáveis. Para o Ensaio Cometa foram analisadas 2 x 100 nucleóides/indivíduo (com e sem enzima OGG1).

Sub-Amostras	-OGG1 (X $\pm$ DP)	+OGG1 (X $\pm$ DP)	P
CDI (n=14)	1,9 $\pm$ 0,53	2,7 $\pm$ 0,47	0,0003*
AE (n=10)	1,8 $\pm$ 0,79	2,5 $\pm$ 0,53	0,03*
Controle (n=21)	1,52 $\pm$ 0,68	2,6 $\pm$ 0,5	<0.0001*

P: Teste de Dunnett com $\alpha=0,05$ (+OGG1 em relação a -OGG1);

X $\pm$ DP: Média $\pm$ Desvio Padrão;

*: estatisticamente significativo

4.2.4 Análise da extensão dos níveis basais de lesões no DNA (Ensaio Cometa) e danos nos cromossomos (Teste do MN e IDN) na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias

Inicialmente, foi subtraído o valor do escore de dano sem enzima (-OGG1), do valor do escore de dano com enzima (+OGG1), sendo esse resultado denominado Dano Oxidativo, e empregado nas análises seguintes. O escore de dano com enzima (+OGG1), por representar os danos oxidativos causados por 8-oxoG, juntamente com o total de danos ocasionados por quebras de fita simples no DNA, neste estudo também foi nomeado como Dano Geral.

Dessa forma, a análise do grau de danos no DNA (Geral e Oxidativo), detectados pelo Ensaio Cometa, e danos cromossômicos detectados pelo Teste do MN e IDN, observados em linfócitos de sangue periférico na sub-amostra de pacientes com CDI (n=14), AE (n=10) e controles (n=21) está apresentada nas Tabelas 9 e 10, divididas em relação à idade (≤ 45 anos e > 45 anos).

Na análise dos três grupos separadamente, comparando as duas faixas etárias, foi observado que o aumento da idade interfere somente no grupo controle, em que mulheres acima dos 45 anos possuem frequência de MNs significativamente maior do que mulheres com idade até 45 anos ($P<0,05$). Os valores médios de IDN, Dano Oxidativo e Dano Geral não diferiram significativamente em relação à faixa etária nos três grupos estudados (Tabela 9).

Analisando indivíduos até 45 anos de idade, foi observado que pacientes com CDI apresentam frequência de MNs significativamente maior do que mulheres sadias ($P<0,01$) (Tabela 10). Os valores médios de IDN, Dano Oxidativo e Dano Geral não diferiram significativamente entre os três grupos quanto à faixa etária (Tabela 10).

Tabela 9. Valores médios $\pm$ Desvio Padrão de IDN, frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral observados em linfócitos de sangue periférico na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias de acordo com a idade (≤ 45 anos e > 45 anos). Para o Teste do MN foram analisadas 1000 células/indivíduo. Para o Ensaio Cometa foram analisadas 2 x 100 nucleóides/indivíduo (com e sem enzima hOGG1).

Citogenética	Pacientes com CDI ($X \pm DP$)		P
	≤ 45 anos (n=6)	> 45 anos (n=8)	
IDN	1,36 $\pm$ 0,14	1,32 $\pm$ 0,16	0,59
Frequência de MNs	12,0 $\pm$ 0,89	13,1 $\pm$ 2,59	0,33
Dano Oxidativo	0,98 $\pm$ 0,63	1,13 $\pm$ 0,66	0,67
Dano Geral	3,20 $\pm$ 0,61	3,31 $\pm$ 0,44	0,71
Citogenética	Pacientes com AE ($X \pm DP$)		P
	≤ 45 anos (n=2)	> 45 anos (n=8)	
IDN	1,23 $\pm$ 0	1,28 $\pm$ 0,05	0,23
Frequência de MNs	10,5 $\pm$ 2,12	11,25 $\pm$ 2,66	0,72
Dano Oxidativo	1,0 $\pm$ 0,52	0,82 $\pm$ 0,62	0,72
Dano Geral	2,93 $\pm$ 0	3,12 $\pm$ 0,29	0,59
Citogenética	Controle ($X \pm DP$)		P
	≤ 45 anos (n=8)	> 45 anos (n=13)	
IDN	1,45 $\pm$ 0,14	1,34 $\pm$ 0,16	0,13
Frequência de MNs	10,62 $\pm$ 0,74	12,08 $\pm$ 1,66	$<0,05^*$
Dano Oxidativo	1,37 $\pm$ 0,74	0,94 $\pm$ 0,58	0,15
Dano Geral	3,23 $\pm$ 0,67	2,99 $\pm$ 0,39	0,30

P: Teste ANOVA com $\alpha=0,05$ e Teste de Tukey com $\alpha=0,01$; $X \pm DP$: Média $\pm$ Desvio Padrão; *: estatisticamente significativo

Tabela 10. Valores médios $\pm$ Desvio Padrão de IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral observados em linfócitos de sangue periférico na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias divididas em relação à idade (≤ 45 anos e > 45 anos). Para o Teste do MN foram analisadas 1000 células/indivíduo. Para o Ensaio Cometa foram analisadas 2 x 100 nucleóides/indivíduo (com e sem enzima hOGG1).

Citogenética	≤ 45 anos ($X \pm DP$)			P_1	P_2
	CDI (n=6)	AE (n=2)	Controle (n=8)		
IDN	1,36 $\pm$ 0,14	1,23 $\pm$ 0	1,45 $\pm$ 0,14	0,29	0,07
Frequência de MN	12,0 $\pm$ 0,89	10,5 $\pm$ 2,12	10,6 $\pm$ 0,74	<0,01*	0,87
Dano Oxidativo	0,98 $\pm$ 0,63	1,0 $\pm$ 0,52	1,37 $\pm$ 0,74	0,32	0,54
Dano Geral	3,20 $\pm$ 0,61	2,93 $\pm$ 0	3,23 $\pm$ 0,67	0,93	0,56
Citogenética	> 45 anos ($X \pm DP$)			P_1	P_2
	CDI (n=8)	AE (n=8)	Controle (n=13)		
IDN	1,32 $\pm$ 0,16	1,28 $\pm$ 0,05	1,34 $\pm$ 0,16	0,79	0,63
Frequência de MN	13,12 $\pm$ 2,59	11,25 $\pm$ 2,66	12,08 $\pm$ 1,66	0,27	0,61
Dano Oxidativo	1,13 $\pm$ 0,66	0,82 $\pm$ 0,62	0,94 $\pm$ 0,58	0,50	0,68
Dano Geral	3,31 $\pm$ 0,44	3,12 $\pm$ 0,29	2,99 $\pm$ 0,39	0,10	0,58

P: Teste ANOVA com $\alpha=0,05$ e Teste de Tukey com $\alpha=0,01$;

X $\pm$ DP: Média $\pm$ Desvio Padrão;

*: estatisticamente significativo;

1: CDI em relação ao controle;

2: AE em relação ao controle

4.3 Análise das influências moleculares e bioquímicas sobre os dados citogenéticos

São apresentados a seguir os dados referentes à análise citogenética dos níveis basais de lesões no DNA e nos cromossomos (IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral), visando identificar possível relação com os dados obtidos nas análises molecular (polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1*) e bioquímica (dosagem de folato, vitamina B12 e GSH-Px) realizadas na sub-amostra de pacientes com CDI (n=14), AE (n=10) e mulheres sadias (n=21).

4.3.1 Distribuição dos genótipos referentes ao polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias utilizadas na análise bioquímica e citogenética

A distribuição das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* (C>G) na sub-amostra de pacientes com CDI (n=14), AE (n=10) e mulheres sadias (n=21) está apresentada na Tabela 11.

Foi observado que a frequência de indivíduos heterozigotos (CG) foi maior entre mulheres sadias (38,1%), no entanto, nesse grupo não foram encontrados indivíduos homozigotos para o alelo polimórfico (GG).

Além disso, não houve diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* entre os três subgrupos de estudo (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias utilizadas nas análises citogenética e bioquímica.

Locus	Genótipo	Número/Total (%)			OR ₁ (95% IC)	OR ₂ (95% IC)	P ₁	P ₂
		Pacientes CDI (n=14)	Pacientes AE (n=10)	Controles (n=21)				
<i>hOGG1</i>	CC	9/14 (64,3)	7/10 (70)	13/21 (61,9)	1,0 (referência)	1,0 (referência)	---	---
	CG	4/14 (28,6)	2/10 (20)	8/21 (38,1)	1,38 (0,32-6,03)	2,15 (0,36-13,05)	0,95	0,67
	GG	1/14 (7,1)	1/10 (10)	---	0	0	0,89	0,80
	CG + GG	5/14 (35,7)	3/10 (30)	8/21 (38,1)	1,11 (0,27-4,51)	1,44 (0,29-7,21)	0,83	0,97
Alelos (Frequência)								
	C	0,79	0,80	0,80	0,94 (0,47-1,87)	---	1,0	---
	G	0,21	0,20	0,20				

P: Teste Exato de Fisher com $\alpha=0,01$; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; 1: CDI em relação ao controle; 2: AE em relação ao controle.

4.3.2 Análise dos níveis basais de danos no DNA e nos cromossomos, em relação ao polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias

Foi realizado um estudo das lesões espontâneas no DNA (Dano Geral e Dano Oxidativo) e dos danos cromossômicos (Frequência de MNs e IDN) de acordo com a presença/ausência do alelo polimórfico Ser326Cys *hOGG1* (C>G) na sub-amostra de pacientes com CDI (n=14), AE (n=10) e mulheres sadias (n=21) (Tabelas 12 e 13).

Na análise dos três grupos de estudo, não foi apontada influência dos diferentes genótipos para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* sobre os resultados de IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral, ou seja, a presença do alelo polimórfico (G) não está associada com a produção de lesões espontâneas no DNA (Tabela 12).

Além disso, no estudo de pacientes com CDI vs. controles, e pacientes com AE vs. controles, fragmentados quanto à presença do alelo polimórfico (G), também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os dados citogenéticos (Tabela 13). Pacientes com CDI vs. pacientes com AE também não apresentou resultados significativos (Dados não apresentados em tabelas).

Tabela 12. Valores médios $\pm$ Desvio Padrão de IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral observados em linfócitos de sangue periférico na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias de acordo com a ausência (CC) ou presença (CG+GG) do alelo polimórfico Ser326Cys *hOGG1*. Para o Teste do MN foram analisadas 1000 células/indivíduo. Para o Ensaio Cometa foram analisadas 2 x 100 nucleóides/indivíduo (com e sem enzima *hOGG1*).

Citogenética	Pacientes com CDI (X $\pm$ DP)		P
	CC (n=9)	CG + GG (n=5)	
IDN	1,29 $\pm$ 0,12	1,43 $\pm$ 0,17	0,09
Frequência de MNs	12,2 $\pm$ 1,09	13,4 $\pm$ 3,21	0,33
Dano Oxidativo	1,12 $\pm$ 0,69	0,96 $\pm$ 0,56	0,67
Dano Geral	3,16 $\pm$ 0,55	3,45 $\pm$ 0,36	0,31
Citogenética	Pacientes com AE (X $\pm$ DP)		P
	CC (n=7)	CG + GG (n=3)	
IDN	1,36 $\pm$ 0,19	1,26 $\pm$ 0,05	0,60
Frequência de MNs	10,7 $\pm$ 1,5	12,0 $\pm$ 4,36	0,51
Dano Oxidativo	0,71 $\pm$ 0,56	1,20 $\pm$ 0,56	0,24
Dano Geral	3,06 $\pm$ 0,2	3,13 $\pm$ 0,45	0,75
Citogenética	Controle (X $\pm$ DP)		P
	CC (n=13)	CG + GG (n=8)	
IDN	1,34 $\pm$ 0,16	1,44 $\pm$ 0,16	0,20
Frequência de MNs	11,6 $\pm$ 1,71	11,4 $\pm$ 1,3	0,74
Dano Oxidativo	1,16 $\pm$ 0,6	1,01 $\pm$ 0,79	0,61
Dano Geral	3,11 $\pm$ 0,57	3,03 $\pm$ 0,44	0,74

P: Teste ANOVA com $\alpha=0,05$; X $\pm$ DP: Média $\pm$ Desvio Padrão

Tabela 13. Valores médios $\pm$ Desvio Padrão de IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral observados em linfócitos de sangue periférico na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres sadias divididas em relação a ausência (CC) ou presença (CG+GG) do alelo polimórfico Ser326Cys *hOGG1*. Para o teste do MN foram analisadas 1000 células/indivíduo. Para o Ensaio Cometa foram analisadas 2 x 100 nucleóides/indivíduo (com e sem enzima *hOGG1*).

Citogenética	CC (X $\pm$ DP)			P_1	P_2
	CDI (n=9)	AE (n=7)	Controle (n=13)		
IDN	1,34 $\pm$ 0,16	1,36 $\pm$ 0,19	1,29 $\pm$ 0,12	0,61	0,82
Frequência de MN	11,6 $\pm$ 1,71	10,7 $\pm$ 1,5	12,2 $\pm$ 1,09	0,64	0,26
Dano Oxidativo	1,12 $\pm$ 0,69	0,71 $\pm$ 0,56	1,16 $\pm$ 0,6	0,87	0,12
Dano Geral	3,16 $\pm$ 0,55	3,06 $\pm$ 0,2	3,11 $\pm$ 0,57	0,85	0,83
Citogenética	CG + GG (X $\pm$ DP)			P_1	P_2
	CDI (n=5)	AE (n=3)	Controle (n=8)		
IDN	1,43 $\pm$ 0,17	1,26 $\pm$ 0,05	1,44 $\pm$ 0,16	0,90	0,10
Frequência de MN	13,4 $\pm$ 3,21	12,0 $\pm$ 4,36	11,4 $\pm$ 1,3	0,13	0,70
Dano Oxidativo	0,96 $\pm$ 0,56	1,20 $\pm$ 0,56	1,01 $\pm$ 0,79	0,92	0,71
Dano Geral	3,45 $\pm$ 0,36	3,13 $\pm$ 0,45	3,03 $\pm$ 0,44	0,10	0,75

P : Teste ANOVA com $\alpha=0,05$;
 X $\pm$ DP: Média $\pm$ Desvio Padrão;
 1: CDI em relação ao controle;
 2: AE em relação ao controle

4.3.3 Análise da correlação entre idade, níveis basais de lesões no DNA, danos cromossômicos, e dosagens de folato, vitamina B-12 e GSH-Px na sub-amostra de pacientes com CDI, AE e controles.

Foi avaliado o grau de associação entre os resultados de idade, folato (ng/mL), vitamina B12 (pg/mL), GSH-Px (U/g Hb), Frequência de MNs, IDN, Dano Oxidativo e Dano Geral na sub-amostra de pacientes com CDI (n=14), AE (n=10) e mulheres sadias (n=21), analisando cada grupo separadamente (Tabela 14).

Quando os coeficientes de correlação (r) apresentaram significância estatística, estes foram novamente analisados para verificar uma possível relação de dependência entre as variáveis citogenéticas e bioquímicas (Teste de Regressão Linear $\alpha=0,05$: Gráficos 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Analisando as pacientes com CDI, foi observada significativa correlação entre Dano Oxidativo e Dano Geral ($r=0,6288$ e $p=0,0160$), ou seja, quando os valores de Dano Oxidativo crescem, nota-se também o aumento dos níveis de Dano Geral. Além disso, houve correlação inversa significativa entre Idade e Folato ($r=-0,5458$ e $p=0,0434$) (Tabela 14).

No grupo de pacientes com AE, também foram encontradas fortes correlações positivas entre Folato e GSH-Px ($r=0,6372$ e $p=0,0475$), Vitamina B12 e Dano Oxidativo ($r=0,7832$ e $p=0,0074$), e GSH-Px e Frequência de MNs ($r=0,7715$ e $p=0,0089$).

Já no grupo controle, houve apenas a correlação significativa entre Idade e Frequência de MNs ($r=0,4643$ e $p=0,0339$) (Tabela 14).

Quanto à análise das possíveis relações de dependência entre as variáveis estatisticamente correlacionadas na análise anterior, foi verificado que todas as associações foram significativamente dependentes, ou seja, variam de forma proporcional (Gráficos 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Tabela 14. Correlação entre idade, níveis de folato, vitamina B12, GSH-Px, frequência de MN, IDN, Dano Oxidativo e Dano Geral em sangue periférico da sub-amostra de pacientes com CDI, AE e mulheres saudas.

Pacientes com CDI (n=14)								
	Idade	Folato	Vitamina B12	GSH-Px	Frequência de MNs	IDN	Dano Oxidativo	Dano Geral
Idade	1,0000	---	---	---	---	---	---	---
Folato	-0,5458*	1,0000	---	---	---	---	---	---
Vitamina B12	-0,0605	0,1840	1,0000	---	---	---	---	---
GSH-Px	0,4460	-0,1467	-0,4097	1,0000	---	---	---	---
Frequência de MNs	0,4805	0,1157	-0,2154	0,3390	1,0000	---	---	---
IDN	-0,2084	0,4375	-0,4286	0,0528	0,4634	1,0000	---	---
Dano Oxidativo	0,0540	-0,1130	0,2693	0,1869	-0,2641	-0,2333	1,0000	---
Dano Geral	0,0796	0,0881	0,2660	0,1410	-0,2527	0,0439	0,6288*	1,0000
Pacientes com AE (n=10)								
	Idade	Folato	Vitamina B12	GSH-Px	Frequência de MNs	IDN	Dano Oxidativo	Dano Geral
Idade	1,0000	---	---	---	---	---	---	---
Folato	0,0527	1,0000	---	---	---	---	---	---
Vitamina B12	-0,4980	-0,2505	1,0000	---	---	---	---	---
GSH-Px	0,5353	0,6372*	-0,2453	1,0000	---	---	---	---
Frequência de MNs	0,2162	0,5605	-0,0114	0,7715*	1,0000	---	---	---
IDN	0,2499	-0,5471	-0,0208	-0,0757	-0,3454	1,0000	---	---
Dano Oxidativo	-0,1942	0,0286	0,7832*	0,1512	0,2655	0,1356	1,0000	---
Dano Geral	0,4128	0,3846	-0,4129	0,4258	0,5893	-0,3410	-0,4397	1,0000
Controle (n=21)								
	Idade	Folato	Vitamina B12	GSH-Px	Frequência de MNs	IDN	Dano Oxidativo	Dano Geral
Idade	1,0000	---	---	---	---	---	---	---
Folato	0,0700	1,0000	---	---	---	---	---	---
Vitamina B12	0,0092	-0,1406	1,0000	---	---	---	---	---
GSH-Px	-0,1462	-0,0456	-0,1301	1,0000	---	---	---	---
Frequência de MNs	0,4643*	-0,2732	-0,2626	-0,2248	1,0000	---	---	---
IDN	-0,3364	-0,0432	-0,1478	0,3759	0,0172	1,0000	---	---
Dano Oxidativo	-0,3354	-0,3526	-0,2042	0,2222	0,0520	0,2713	1,0000	---
Dano Geral	-0,0378	0,2334	-0,0112	0,1557	-0,1417	0,0578	0,3738	1,0000

r: Coeficiente de Correlação de Pearson $\alpha=0,05$; *: estatisticamente significativo

Pacientes com CDI (Gráfico 1)

Pacientes com CDI (Gráfico 2)

Pacientes com AE (Gráfico 3)

Pacientes com AE (Gráfico 4)

Pacientes com AE (Gráfico 5)

Controles (Gráfico 6)

5. DISCUSSÃO

5.1 Os polimorfismos Ser326Cys *hOGG1* e Arg38Trp *AHCY* e a suscetibilidade ao câncer de mama

Os danos oxidativos provocados pelos RROs no DNA têm grande importância em vários processos patológicos, incluindo carcinogênese. Tais lesões são geradas tanto pelo ambiente quanto pelo metabolismo celular normal. Sabe-se que o tipo de lesão mais abundante no DNA corresponde a 8-oxoG, a qual é altamente mutagênica resultando em transversões GC>TA (Boiteux & Radicella, 1999). Contudo, as lesões 8-oxoG podem ser retiradas via BER pela enzima liase 8-oxoG glicosilase apurínica/apirimídica (OGG1), a qual é codificada pelo gene *hOGG1* (Slupphaug *et al.*, 2003).

Por se tratar de um importante gene de reparo do DNA, alguns polimorfismos em *hOGG1* já foram estudados, especialmente o Ser326Cys *hOGG1*, o qual foi inicialmente associado à redução da atividade enzimática de OGG1 em sistema de ensaio de complementação bacteriana (Kohno *et al.*, 1998).

Além das alterações em genes envolvidos no reparo de danos oxidativos no DNA, distúrbios que acometem os sistemas enzimáticos antioxidantes também são importantes na elevação do estresse oxidativo intracelular. Um desses distúrbios pode ocorrer devido a alterações no metabolismo do aminoácido metionina, por exemplo. Sabe-se que a redução do funcionamento deste importante ciclo tem várias consequências, como a hiperhomocisteinemia, a qual produz estresse oxidativo, e também alterações na produção de glutatona (GSH), importante elemento na proteção antioxidante (Lu, 2009).

Dessa forma, alterações genéticas em enzimas que participam do ciclo da metionina, como o gene *AHCY*, codificante da enzima SAHH, poderiam também estar associados ao processo carcinogênico. Alguns SNPs já foram localizados em regiões codificantes do gene *AHCY*, dentre eles, o polimorfismo *AHCY* Arg38Trp parece atribuir baixa atividade para a enzima SAHH (Feng *et al.*, 2009). Contudo, não há na literatura

trabalhos sobre *AHCY* Arg38Trp em casos de câncer, o que fez com que tal polimorfismo se tornasse um alvo para o nosso estudo.

Com base nessas informações, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se os polimorfismos Ser326Cys do gene *hOGG1* e Arg38Trp do gene *AHCY* estão associados ao risco de CM. Para isso, foram determinadas suas frequências alélicas e genotípicas numa amostra de 54 pacientes com CDI, 10 pacientes com AE e 55 mulheres saudáveis.

Primeiramente foi realizada a caracterização geral da amostra, onde não foram observadas diferenças estatísticas quanto à idade, hábito tabagista, consumo de álcool, idade da menarca, menopausa, uso de hormônios, idade da primeira gestação, ocorrência de abortos e histórico familiar de câncer entre os três grupos estudados.

Em relação ao polimorfismo Ser326Cys *hOGG1*, no nosso estudo não foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas de pacientes com CDI e pacientes com AE em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos na mesma análise realizada somente com mulheres fumantes e/ou consumidoras de álcool. Dessa forma, o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* não parece estar relacionado ao risco de desenvolvimento de CM.

Os trabalhos na literatura mostram resultados conflitantes para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* em câncer, especialmente em relação ao CM (Vogel *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2005; Rossner Jr *et al.*, 2006). Estudos epidemiológicos para diversos tipos de neoplasias mostram que o alelo polimórfico (G) varia de acordo com a população, sendo mais prevalente em asiáticos (0,33-0,45) do que em caucasianos (0,22-0,27) (Weiss *et al.*, 2005). Num estudo caso-controle em uma amostra de pacientes brasileiros diagnosticados com câncer gástrico, Hanaoka *et al.* (2001) encontraram frequências alélicas semelhantes ao nosso estudo, porém seus resultados revelaram associação do genótipo homozigoto selvagem (CC) com o risco para a doença em fumantes.

Em relação ao polimorfismo Arg38Trp *AHCY*, não foram observados indivíduos homozigotos para o alelo polimórfico (TT) nos três grupos estudados. Além disso,

houve apenas um único indivíduo heterozigoto (CT) nos grupos de pacientes com CDI e controles. No grupo de pacientes com AE foram encontrados apenas indivíduos homozigotos selvagens (CC). Dessa forma, não foram observadas diferenças nas frequências genotípicas e alélicas de pacientes com CDI em relação ao grupo controle e, portanto, o polimorfismo Arg38Trp *AHCY* não parece está relacionado com o risco de desenvolvimento de CM.

Não há na literatura trabalhos epidemiológicos mostrando o polimorfismo Arg38Trp *AHCY* em casos de câncer. No entanto, há um importante estudo caso-controle realizado por Gellekink *et al.* (2004) determinando a frequência do alelo (T) sobre trombose venosa recorrente numa população holandesa. A trombose venosa recorrente, assim como alguns tipos de câncer, apresenta a hiperhomocisteinemia como fator de risco. Dessa forma, tal estudo encontrou frequências alélicas para Arg38Trp *AHCY* semelhantes ao nosso trabalho. O grupo ainda analisou os efeitos do polimorfismo Arg38Trp *AHCY* sobre a homocisteína plasmática e sobre o risco de desenvolver trombose venosa, mas não encontraram relação conclusiva. No nosso estudo, devido ao número insuficiente de indivíduos portadores do alelo polimórfico (T), o gene *AHCY* não foi submetido às demais avaliações deste trabalho.

5.2 Danos oxidativos espontâneos no DNA e mecanismos de proteção antioxidante

5.2.1 Caracterização geral e frequência do polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* da sub-amostra utilizada nas análises bioquímica e citogenética

Foram considerados idade, hábito tabagista, consumo de álcool, idade da menarca, idade da menopausa, uso de hormônios, idade da primeira gestação, ocorrência de abortos e história familiar de câncer, havendo resultados semelhantes entre pacientes com CDI, AE e controles para todos os parâmetros. Isso garante a uniformidade da sub-amostra estudada, o que fornece segurança para os dados obtidos nos ensaios citogenéticos e bioquímicos.

Além disso, também foram estimadas as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1*, a fim de verificar se são semelhantes com os resultados obtidos na análise molecular da amostra total. Dessa forma, em analogia com a amostra total utilizada neste trabalho, na sub-amostra também não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

5.2.2 Níveis eritrocitários de GSH-PX e níveis plasmáticos de folato e vitamina B12

Sabe-se que o estado nutricional de folato e vitamina B12 depende principalmente da disponibilidade nos alimentos, digestão e absorção (Donelly, 2001; McNulty & Scott, 2008). Por outro lado, os processos bioquímicos que associam alterações sanguíneas de tais vitaminas ao risco de câncer ainda não foram totalmente esclarecidos, sendo apontados alguns mecanismos como: erros na síntese de DNA durante a replicação (Blount *et al.*, 1997), hipometilação (Davis & Uthus, 2004), e aumento do estresse oxidativo (Wu & Wu, 2002; Lu, 2009; Martinov *et al.*, 2009).

A respeito do estresse oxidativo ocasionado pela deficiência de folato e vitamina B12, sua origem pode estar tanto no aumento da homocisteína, quanto nas alterações dos níveis de glutathione (GSH) (Martinov *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo modula a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, assim como os níveis de moléculas antioxidantes (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2001).

A GSH-Px dosada nos eritrócitos é uma importante enzima que protege a hemoglobina contra os RROs, utilizando a GSH. Ela também está presente na maioria dos tecidos (Arthur, 2000). Dessa forma, a dosagem da atividade da GSH-Px eritrocitária tem sido empregada como biomarcador de estresse oxidativo em diversas patologias, inclusive câncer (Andersen *et al.*, 1997; Gromadzinska *et al.*, 2008).

Com base nessas informações, um dos objetivos do nosso estudo foi comparar os níveis eritrocitários de GSH-Px e níveis plasmáticos de folato e vitamina B12 de mulheres saudáveis (n=21), pacientes com AE (n=10) e CDI (n=14) não submetidas a tratamento quimio/radioterápico. Para isso, os três grupos de estudo foram divididos em relação à faixa etária (≤ 45 anos e > 45 anos) a fim de verificarmos se a idade interfere da mesma forma sobre as dosagens sanguíneas para cada tipo de lesão mamária.

Na análise dos três grupos de estudo, foi observado que os valores de folato e vitamina B12, em média, se enquadram nos limites normais de referência fornecidos

pelos kits de dosagem (3 - 17 ng/mL e 174 - 878 pg/mL, respectivamente), não havendo, portanto, alterações nutricionais para tais vitaminas em ambas as faixas etárias.

No entanto, no estudo de cada grupo separadamente, foi apontado que a idade pode interferir nos níveis de folato, mas somente no grupo de pacientes com CDI. Mulheres acima de 45 anos apresentaram, em média, níveis plasmáticos de folato significativamente menores do que mulheres até 45 anos. De fato, houve correlação inversa significativa entre idade e folato, ou seja, quanto maior a idade da paciente, menor a dosagem de folato.

Tais resultados podem explicados pelo fato de indivíduos idosos mostrarem diminuição no processo de absorção de diversos micronutrientes, especialmente do folato (Lökk, 2003). Além disso, o processo neoplásico em si exige grande demanda de folato para a rápida divisão celular, já que é um nutriente essencial na produção de nucleotídeos (Stover, 2004). Dessa forma, o recrutamento do folato para o crescimento do tumor também pode fazer com que seus níveis diminuam no plasma (Suh *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2008).

A respeito da GSH-Px eritrocitária, seus valores de referência variam de acordo com a população e com o método de dosagem (Habif *et al.*, 2001). Além disso, não há trabalhos prévios estabelecendo os limites normais de referência de GSH-Px na população brasileira. Dessa forma, em nosso estudo tomamos como referência normal os níveis de GSH-Px do grupo controle.

Verificamos que os valores de GSH-Px para pacientes com AE e CDI, em média, se enquadram nos limites encontrados para o grupo controle (30 – 54 U/g Hb), não havendo, portanto, alterações bioquímicas em ambos os grupos. No entanto, foi verificado que pacientes com CDI acima dos 45 anos apresentam, em média, níveis de GSH-Px eritrocitária significativamente maiores do que mulheres sadias na mesma faixa etária.

Observamos que nossos resultados estão de acordo com Ray *et al.* (2000) e Moradi *et al.* (2008). Este último sugere que pacientes com CM apresentam aumento na atividade da GSH-Px em resposta ao aumento na produção de RROs provocado pelo

metabolismo do próprio tumor. Curiosamente, as células cancerosas também sofrem com o aumento estresse oxidativo, de modo que a produção de GSH e GSH-Px protege o tumor em processos importantes como crescimento, mutagênese, síntese de DNA, multi-resistência a drogas e radiação (Brown & Bicknell, 2001; Estrela *et al.*, 2006).

Adicionalmente, verificou-se também que pacientes com CDI acima dos 45 anos apresentam, em média, níveis de GSH-Px significativamente maiores do que pacientes com AE na mesma faixa etária. Tais resultados estão de acordo com Seven *et al.* (1998), que avaliaram o estresse oxidativo em doenças da mama utilizando alguns biomarcadores como GSH-Px, superóxido dismutase e GSH. Além disso, Tas *et al.* (2005) analisando amostras cirúrgicas de tecido mamário também detectaram aumento significativo de GSH-Px em tumor maligno em comparação com fibroadenoma.

Nossos resultados, juntamente com os demais autores, apontam que o estresse oxidativo é significativamente mais intenso em pacientes com CDI do que em pacientes com AE, o que demonstra sua relação com a carcinogênese.

A respeito da influência da idade sobre os níveis de GSH-Px, nossos resultados não apontam tal relação. Alguns trabalhos realizados em indivíduos sadios também não mostraram evidências (Habif *et al.*, 2001; Mendoza-Núñez *et al.*, 2010). No entanto, pacientes com AE e CDI apresentaram alta correlação entre idade e GSH-Px, que apesar de não significativa, sugere que o pequeno número amostral pode ter ocultado uma possível associação entre idade e GSH-Px.

5.2.3 Teste do MN, IDN e Ensaio Cometa

O Teste do MN é uma técnica citogenética de biomonitoramento empregada na detecção de mutações fixadas que persistem após um ciclo de divisão celular. Tais mutações resultam em quebras e/ou perdas cromossômicas, as quais são visíveis pela formação dos MNs (Kassie *et al.*, 2000). Além disso, uma importante vantagem proporcionada pelo Teste do MN é a possibilidade da quantificação da taxa de divisão nuclear numa população de células em divisão, também conhecida por Índice de Divisão Nuclear (IDN) (Fenech, 1997).

Dessa forma, o Teste do MN tem sido amplamente aplicado na identificação de fatores genéticos e dietéticos que apresentam impacto significativo na instabilidade genômica e incidência de câncer (Fenech, 2002; Kimura *et al.*, 2004).

Com base nessas informações, um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar o grau de danos cromossômicos espontâneos pelo Teste do MN e IDN em linfócitos de mulheres sadias (n=21), pacientes com AE (n=10) e CDI (n=14) não submetidas a tratamento quimio/radioterápico. Adicionalmente, os três grupos de estudo foram divididos em relação à faixa etária (≤ 45 anos e > 45 anos) a fim de verificarmos se a idade interfere da mesma forma sobre os danos cromossômicos para cada tipo de lesão mamária.

Foi observado que somente mulheres sadias acima de 45 anos apresentam frequência de MNs significativamente maior do que mulheres com idade até 45 anos. De fato, no grupo controle houve correlação significativa entre idade e frequência de MNs, ou seja, a quantidade de MNs aumenta em função do aumento da idade. Em outros estudos, tal associação em indivíduos sadios também já foi demonstrada (Bolognesi *et al.*, 1997; Bolognesi *et al.*, 1999).

Além disso, em indivíduos até 45 anos de idade, foi observado que pacientes com CDI apresentam frequência de MNs significativamente maior do que mulheres sadias, evidenciando a relação entre danos cromossômicos espontâneos e incidência de CM.

Nossos resultados estão de acordo com diversos estudos caso-controle, tendo o aumento da frequência basal de MNs em linfócitos sido relatado em vários tipos de câncer (Duffaud *et al.*, 1997; Hamurcu *et al.*, 2008; Milošević-Djordjevic *et al.*, 2010), inclusive em CM (Santos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011).

A respeito do Ensaio Cometa alcalino, este método detecta lesões reparáveis, ao contrário do Teste do MN, que detecta mutações fixadas (Kassie *et al.*, 2000). Além disso, a incorporação de uma etapa extra de digestão com a endonuclease OGG1 permite a quantificação de 8-oxoG, a qual é a lesão oxidativa mais abundante no DNA (Smith *et al.*, 2006).

Devido a sua alta sensibilidade na detecção de quebras e reparo do DNA, o Ensaio Cometa tornou-se uma importante ferramenta em estudos epidemiológicos na associação de fatores genéticos e nutricionais com o risco de câncer (Wasson *et al.*, 2008).

Dessa forma, um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar a extensão dos danos oxidativos espontâneos no DNA pelo Ensaio Cometa alcalino utilizando a endonuclease OGG1 em linfócitos de mulheres saudáveis (n=21), pacientes com AE (n=10) e CDI (n=14) não submetidas a tratamento quimio/radioterápico.

Inicialmente foi analisado o desempenho da enzima OGG1 em detectar danos oxidativos nos três subgrupos por meio da comparação entre os valores médios do escore de dano sem enzima (-OGG1) e escore de dano com enzima (+OGG1), tendo sido demonstrado eficiência positiva. O valor de Dano Oxidativo foi obtido por meio da subtração dos escores de dano com e sem enzima. O valor de Dano Geral foi representado pelo escore de dano com enzima (+OGG1), exibindo tanto os danos oxidativos causados por 8-oxoG, quanto os danos ocasionados por quebras de fita simples no DNA.

Nas nossas análises, os três grupos de estudo foram divididos em relação à faixa etária (≤ 45 anos e > 45 anos) a fim de verificarmos se a idade interfere da mesma forma sobre os danos espontâneos ao DNA. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas de Dano Oxidativo e Dano Geral quanto à idade ou tipo de lesão mamária,

sugerindo que o grau de danos no DNA não está associado à ocorrência de CM nesta amostra de estudo.

Nossos dados, entretanto, não estão de acordo com outros trabalhos. Diversos estudos caso-controle avaliaram o grau de danos espontâneos no DNA em vários tipos de câncer, inclusive CM, e apontam aumento significativo de danos em pacientes com câncer (Rajeswari *et al.*, 1999; Schabath *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Lou *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009).

Por outro lado, somente em pacientes com CDI foi observada significativa correlação entre Dano Oxidativo e Dano Geral, ou seja, os valores de Dano Geral aumentam em função da elevação dos valores de Dano Oxidativo. Tal resultado indica que, nessas pacientes, o dano oxidativo é responsável por grande parte das lesões espontâneas detectadas no DNA.

O nosso estudo também se propôs a investigar a influência dos polimorfismos Ser326Cys *hOGG1* e Arg38Trp *AHCY* sobre a extensão dos danos no DNA e nos cromossomos (IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral) da sub-amostra estudada. Contudo, para o gene *AHCY* tal análise não foi realizada, pois a quantidade de indivíduos portadores do alelo polimórfico (T) encontrada foi insuficiente. Dessa forma, realizamos a análise apenas para o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1*, dividindo os grupos quanto à presença do alelo polimórfico (G).

Observamos que de modo geral, não há influência do polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* sobre nenhum dos resultados citogenéticos (IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral), ou seja, a presença do alelo polimórfico (G) não está associada com a produção de lesões espontâneas no DNA nesta amostra de pacientes com lesões mamárias. Tais resultados estão de acordo com Poplawshi *et al.* (2006), que não encontraram influência do alelo Ser326Cys *hOGG1* sobre a ocorrência de danos no DNA estudando pacientes com câncer gástrico.

Paralelamente, nossos resultados também apontam que o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* não altera a atividade da enzima OGG1 *in vivo*, já que o gene

investigado nesse estudo codifica a mesma endonuclease aplicada no Ensaio Cometa. De fato, o impacto do polimorfismo Ser326Cys sobre o gene *hOGG1* já foi questionado em vários momentos. Segundo Weiss *et al.* (2005), as evidências de que o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* afeta as funções de reparo levando a carcinogênese são bastante limitadas.

Nesse mesmo contexto, Mateuca *et al.* (2008) em um estudo sobre exposição ocupacional detectou que trabalhadores apresentando o gene normal *XRCC3*, que repara quebras de fita dupla, e também o polimorfismo Ser326Cys *hOGG1*, apresentavam menos MNs do que aqueles que possuíam o gene normal Ser326Ser *hOGG1*. Dessa forma, foi sugerido que o efeito do polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* na capacidade de reparo do DNA pode variar de acordo com o tipo e extensão dos danos ao DNA, e ainda pode ser influenciado pela interação com outros polimorfismos.

Um dos nossos objetivos foi também investigar a influência dos dados bioquímicos (GSH-Px, folato e vitamina B-12) sobre a extensão dos danos no DNA e nos cromossomos (IDN, Frequência de MNs, Dano Oxidativo e Dano Geral) na sub-amostra estudada. Observamos que nos grupos de mulheres sadias e pacientes com CDI não houve correlações significativas entre os dados citogenéticos e bioquímicos.

Somente no grupo de pacientes com AE foi observada correlação significativa entre GSH-Px e folato. Observando as demais correlações para o folato no mesmo grupo, apesar de não significativas, nota-se que o aumento do folato também eleva a frequência de MNs e o Dano Geral, e diminui o IDN.

Além disso, somente em pacientes com AE foi observada correlação fortemente positiva entre GSH-Px e frequência de MNs. Investigando as demais correlações para GSH-Px e frequência de MNs em pacientes com AE, apesar de não significativas, percebe-se que o aumento de ambas também eleva o folato e o Dano Geral, e diminui o IDN.

Estes resultados sugerem que o folato, em níveis normais, pode estar participando na manutenção das defesas antioxidantes por meio da produção de GSH, e ao

mesmo tempo, provocando instabilidade genômica em pacientes com AE, demonstrado pela frequência de MNs, IDN, Dano Geral e GSH-Px. Alguns autores já apontaram essa dualidade em alguns tumores benignos, sugerindo que o folato pode favorecer a malignização de lesões benignas pré-existentes, porém, esses casos estavam associados ao alto consumo de folato (Suh *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2008).

Adicionalmente, também em pacientes com AE foi observada correlação fortemente significativa entre vitamina B12 e Dano Oxidativo. Isto sugere que a vitamina B12, assim como o folato, também pode estar provocando instabilidade genômica em pacientes com AE, mesmo em níveis plasmáticos normais. Sabe-se que células em proliferação apresentam alta demanda de vitamina B12 para a síntese protéica, de forma que as células tumorais exibem vários receptores para a vitamina B12 (Waibel *et al.*, 2008). Dessa forma, a vitamina B12 ao favorecer o metabolismo do tumor benigno, pode também provocar estresse oxidativo, que é evidenciado pelo Dano Oxidativo em linfócitos.

Por fim, quanto ao IDN, observamos que a ocorrência de lesão mamária (AE e CDI) não influencia significativamente seus valores. Isso foi confirmado por Santos *et al.* (2009), que estudaram danos espontâneos em pacientes com CM. Do mesmo modo, não há correlação estatística do IDN com nenhum dos resultados moleculares, citogenéticos ou bioquímicos. No entanto, como mencionado anteriormente, a correlação entre IDN e folato, juntamente com outros resultados, podem ser sugestivas de instabilidade genômica em pacientes com AE.

A respeito dos efeitos do polimorfismo Ser326Cys *hOGG1* sobre o IDN de pacientes com câncer de mama não tratadas, não encontramos na literatura trabalhos sobre tal abordagem. No entanto, um estudo realizado por Wu *et al.* (2008) demonstrou que culturas de carcinoma de pulmão deficientes para *hOGG1* apresentaram baixa formação de colônias quando tratadas com bleomicina, indicando que alterações na OGG1 perturbam a cinética celular, sendo mais evidente quando associada a um agente mutagênico.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo investigou o grau de danos oxidativos espontâneos no DNA, os níveis sanguíneos de GSH-Px, folato e vitamina B-12, e a frequência dos polimorfismos Ser326Cys *hOGG1* e Arg38Trp *AHCY* de pacientes com AE e CDI e mulheres sadias não submetidas a tratamento quimio/radioterápico. Além disso, investigou se os polimorfismos e os elementos bioquímicos estudados exercem influência sobre a extensão de tais danos oxidativos. Os resultados obtidos e discutidos permitem as seguintes conclusões:

Não foi observada relação entre os polimorfismos Ser326Cys *hOGG1* e Arg38Trp *AHCY* e o risco de desenvolvimento do CM. Quanto ao alelo Ser326Cys *hOGG1*, não há associação com as características anatomopatológicas nas lesões malignas. O alelo Ser326Cys *hOGG1* também não confere risco quando associado ao hábito tabagista e /ou etilista, do mesmo modo que também não interfere na produção de lesões espontâneas no DNA e nos cromossomos.

Nesta amostra de estudo, não há deficiência ou excesso de folato e vitamina B12, bem como não há associação entre variação nos níveis de tais vitaminas e incidência de lesão mamária. No entanto, observamos que aumento da idade provoca a diminuição nos níveis plasmáticos de folato em pacientes com CDI, podendo tal decréscimo ser observado a partir dos 45 anos de idade.

Nesta amostra de estudo, não há alterações bioquímicas na GSH-Px eritrocitária de pacientes com CDI e AE em relação aos limites de referência obtidos a partir do grupo controle, bem como não há influência da idade sobre tais valores. Porém, pacientes com CDI apresentam níveis eritrocitários de GSH-Px significativamente maiores do que pacientes com AE e mulheres sadias na mesma faixa etária, evidenciando a relação entre estresse oxidativo e carcinogênese.

O aumento da idade provoca aumento na frequência de MNs em linfócitos de mulheres sadias, podendo tal acréscimo ser observado a partir dos 45 anos. Além disso,

pacientes com CDI até 45 anos de idade apresentam frequência de MNs significativamente maior do que mulheres sadias na mesma faixa etária, evidenciando a relação entre danos cromossômicos e incidência de CM.

Não houve associação entre o grau de danos espontâneos no DNA (geral e oxidativo) e a ocorrência de lesões mamárias nesta amostra de estudo. Contudo, em pacientes com CDI, o dano oxidativo é responsável por grande parte das lesões espontâneas detectadas no DNA dessas pacientes.

A ocorrência de lesão mamária, juntamente com os demais parâmetros, não exerce influência sobre os valores de IDN, ou seja, a cinética do ciclo celular em linfócitos não foi alterada significativamente. No entanto, somente em pacientes com AE, o folato e a vitamina B12, em níveis plasmáticos normais, podem provocar instabilidade genômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRESTI A (1992). A survey of exact inference for contingency tables. *Statistical Science*, 7:131-153.
- AMES BN; GOLD LS; WILLETTT WC (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:5258-5265.
- ANDERSEN HR; NIELSEN JB; NIELSEN F; GRANDJEAN P (1997). Antioxidative enzyme activities in human Erythrocytes. *Clinical Chemistry*, 43:4562–568.
- ARPINO G; LAUCIRICA R; ELLEDGE RM (2005). Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications. *Annals of Internal Medicine*, 143:446-457.
- ARSOVA-SARAFINOVSKA Z; MATEVSKA N; EKEN A; PETROVSKI D; BANEV S; DZIKOVA S; GEORGIEV V; SIKOLE A; ERDEM O; SAYAL A; AYDIN A; DIMOVSKI AJ (2009). Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int Urol Nephrol*, 41:63–70.
- ARTHUR JR (2000). The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57:1825–1835.
- AYRES M; AYRES JRM; AYRES DL (2007). *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 5ª edição, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília.
- BABSON AL; OLSON DR; PALMIERI T; ROSS AF; BECKER DM; MULQUEEN PJ (1991). The IMMULITE assay tube; a new approach to heterogeneous ligand. *Clin Chem*, 37:1521-1522.
- BALUZ K; TAVARES DO CARMO MG; ROSAS G (2002). O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(4):597-607.
- BASEGIO, Diogenes Luis. *Câncer de mama*. Rio de Janeiro: Revinter, 371 p, 1999.
- BLOOM HJG & RICHARDSON WW (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*, 11:359–377.
- BLOUNT BC; MACK MM; WEHR CM; MACGREGOR JT; HIATT RA; WANG G; WICKRAMASINGHE SN; EVERSON RB; AMES BN (1997). Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3290–3295.
- BOITEUX S; GAJEWSKI E; LAVAL J; DIZDAROGLU M (1992). Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, 31(1):106–110.
- BOITEUX S; RADICELLA JP (1999). Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie.*, 81:59-67.
- BOLOGNESI C; ABBONDANDOLO A; BARALE R; CASALONE R; DALPRÀ L; DE FERRARI M; DEGRASSI F; FORNI A; LAMBERTI L; LANDO C; MIGLIORE L; PADOVAM P; PASQUIM R; PUNTONI R; SBRANA I; STELLA M; BONASSI S (1997). Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid changes, chromosome aberrations, and

micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 6:249-256.

BOLOGNESI C; LANDO C; FORNI A; LANDINI E; SCARPATO R; MIGLIORE L; BONASSI S (1999). Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and Ageing*, 28:393-397.

BROWN NS; BICKNELL R (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 3:323–327.

BRUNER SD; NORMAN DPG; VERDINE GL (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403:859-866.

CROTEAU DL; BOHR VA (1997). Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41):25409–25412.

DAVIS CD; UTHUS EO (2004). DNA Methylation, Cancer Susceptibility, and Nutrient Interactions. *Exp. Biol. Med.*, 229:988-995.

DONNELLY JD (2001). Folic Acid. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(3):183–223.

DUFFAUD F; ORSIERE T; ULANI PV; PELISSIER AL; VOLOT F; FAVRE R; BOTTA A (1997). Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis*, 12(4):227-231.

DUPONT WD; PAGE DL; PARL FF; VNENCAK-JONES CL; PLUMMER WD; RADOS MS; SCHUYLER PA (1994). Long-Term risk of Breast Cancer in women with fibroadenoma. *The New England Journal of Medicine*, 331:10-5.

DUSINSKA M; COLLINS AR (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3):191–205.

DUTHIE SJ (1999). Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *British Medical Bulletin*, 55(3):578-592.

EASTMOND DA; TUCKER JD (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13(1):34-43, 1989.

ELSTON CW & ELLIS IO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19:403-410.

ESTRELA JM; ORTEGA A; OBRADOR E (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43(2):143–181.

FANG YZ; YANG S; WU G (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18:872– 879.

FENECH M (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research*, 392:11-18.

- FENECH M (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182:411-416.
- FENECH M; MORLEY AA (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147(1-2):29-36.
- FENG Q; PELLEYMOUNTER LL; MOON I; KALARI KR; ECKLOFF BE; WIEBEN ED; WEINSHILBOUM RM (2009). Human S-Adenosylhomocysteine Hydrolase: Common Gene Sequence Variation and Functional Genomic Characterization. *J Neurochem.*, 110(6):1806–1817.
- FERREIRA ALA; MATSUBARA LS (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 43(1):61-8.
- FLOHÉ L; GÜNZLER WA (1984). Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol*, 105:114-121.
- GALVÁN-PORTILLO MV; OÑATE-OCAÑA LF; PÉREZ-PÉREZ GI; CHEN J; HERRERA-GOEPFERT R; CHIHU-AMPARAN L; FLORES-LUNA L; MOHAR-BETANCOURT A; LÓPEZ-CARRILLO L (2010). Dietary folate and vitamin B12 intake before diagnosis decreases gastric cancer mortality risk among susceptible MTHFR 677TT carriers. *Nutrition*, 26:201–208.
- GELLEKINK H; HEIJER M DEN; KLUIJTMANS LAJ; HENK J (2004). Effect of genetic variation in the human S-adenosylhomocysteine hydrolase gene on total homocysteine concentrations and risk of recurrent venous thrombosis. *European Journal of Human Genetics*, 12:942–948.
- GENT DC; HOEIJMAKERS JHJ; KANAAR R (2001). Chromosomal Stability and the DNA double-stranded break connection *Nature Reviews Genetics*, 2:196-206.
- GILL HK; IOFFE OB; BERG WA (2003). When is a diagnosis of sclerosing adenosis acceptable at core biopsy? *Radiology*, 228:50–57.
- GIUSTARINI D; DALLE-DONNE I; MILZANI A; ROSSI R (2009). Oxidative stress induces a reversible flux of cysteine from tissues to blood in vivo in the rat. *FEBS Journal*, 276:4946–4958.
- GODDERIS L; BOECK MD; HAUFROID V; EMMERY M; MATEUCA R; GARDINAL S; KIRSCH-VOLDERS M; VEULEMANS H; LISON D (2004). Influence of Genetic Polymorphisms on Biomarkers of Exposure and Genotoxic Effects in Styrene-Exposed Workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44:293–303.
- GROMADZINSKA J; RESZKA E; BRUZELIUS K; WASOWICZ W; AKESSON B (2208). Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur J Nutr*, 47(2):29–50.
- GURAY M; SAHIN AA (2006). Benign Breast Diseases: Classification, Diagnosis, and Management Breast Cancer. *The Oncologist*, 11:435–449.
- HABIF S; MUTAF I; TURGAN A N; ONURB E; DUMANC C; ÖZMENA D; BAYINDIRA O (2001). Age and gender dependent alterations in the activities of glutathione related enzymes in healthy subjects. *Clinical Biochemistry*, 34:667–671.

- HAMURCU Z; DÖNMEZ-ALTUNTAS H; PATIROGLU T (2008). Basal level micronucleus frequency in stimulated lymphocytes of untreated patients with leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 180(2):140-4.
- HANAOKA T; SUGIMURA H; NAGURA K; IHARAB M; LI XJ; HAMADA GS; NISHIMOTO I; KOWALSKID LP; YOKOTA J; TSUGANE S (2001). hOGG1 exon7 polymorphism and gastric cancer in case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Letters*, 170:53-61.
- HARTMANN LC; SELLERS TA; FROST MH; LINGLE WL; DEGNIM AC; GHOSH K; VIERKANT RA; MALONEY SD; PANKRATZ S; HILLMAN DW; SUMAN VJ; JOHNSON J; BLAKE C; TLSTY T; VACHON CM; MELTON JL; VISSCHER DW (2005). Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *The new England journal of Medicine*, 353(3):229-237.
- HOEIJMAKERS JHJ (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411:366-374.
- IARMARCOVAI G; SARI-MINODIER I; CHASPOUL F; BOTTA C; De MEO M; ORSIERE T; BERGE-LEFRANC JL; GALLICE P; BOTTA A (2005). Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms. *Mutagenesis*, 20(6):425–432.
- INCA: Instituto Nacional do Câncer (2009). Home Page: www.inca.gov.br
- JAMES SJ; CUTLER P; MELNYK S; JERNIGAN S; JANAK L; GAYLOR DW; NEUBRANDER JA (2004). Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr*, 80:1611–1617.
- JIAO X; HUANG J; WU S; LV M; HU Y; SU JX; LUO C; BROELSCH CE (2007). hOGG1 Ser326Cys polymorphism and susceptibility to gallbladder cancer in a Chinese population. *Int. J. Cancer*, 121:501–505.
- JONES DP (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295:C849–C868.
- KANG S; KIMA JW; KANG GH; PARK NH; SONG YS; KANG SB; LEE HP (2005). Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 96:173–180.
- KASSIE F; PARZEFALL W; KNASMYLLER S (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 463:13-31.
- KIMURA M; UMEGAKI K; HIGUCHI M; THOMAS P; FENECH M (2004). Methylene-tetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J. Nutr.*, 134:48–56.
- KLEINBAUM DG; KUPPER LL; MORGENSTEN H (1982). *Epidemiologic Research: Principles and Quantitative Methods*. Belmont, CA: Wadsworth.
- KOHNO T; SHINMURA K; TOSAKA M; TANI M; KIM SR; SUGIMURA H; NOHMI T; KASAI H; YOKOTA J (1998). Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene,

that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*, 16:3219-3225.

KRUPA R; SOBCZUK A; POPŁAWSKI T; WOZNIAK K; BLASIAK J (2011). DNA damage and repair in endometrial cancer in correlation with the hOGG1 and RAD51 genes polymorphism. *Mol Biol Rep*, 38:1163–1170.

KUO CS; LIN CY; WU MY; LU CL; HUANG RF (2008). Relationship between folate status and tumour progression in patients with hepatocellular carcinoma. *British Journal of Nutrition*, 100:596–602.

LEAL JF; BLANCO-APARICIO FI; HERNÁNDEZ-LOSA J; RAMÓN Y CAJAL S; CARNERO A; LLEONART ME (2008). S-Adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 29(11):2089–2095.

LIMON-PACHECO J; GONSEBATT ME (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674:137–147.

LOFT S & MØLLER P (2006). Oxidative DNA Damage and Human Cancer: Need for Cohort Studies. *Antioxid. Redox Signal.*, 8:1021–1031.

LÖKK J (2003). News and Views on Folate and Elderly Persons. *Journal of Gerontology: Medical Sciences*, 58A(4):354–361.

LOU J; HE J; ZHENG W; JIN L; CHEN Z; CHEN S; LIN Y; XU S (2007). Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mutat Res*, 617:104–110.

LU SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30:42–59.

MA J; STAMPFER MJ; CHRISTENSEN B; GIOVANNUCCI E; HUNTER DJ; CHEN J; WILLETT WC; SELHUB J; HENNEKENS CH; GRAVEL R; ROZEN R (1999). A Polymorphism of the Methionine Synthase Gene: Association with Plasma Folate, Vitamin B12, Homocyst(e)ine, and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 8: 825–829.

MARTINOV MV; VITVITSKY VM; BANERJEE R; ATAULLAKHANOV FI (2010). The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:89–96.

MARUTI SS; ULRICH CM; WHITE E (2009). Folate and one-carbon metabolism nutrients from supplements and diet in relation to breast cancer risk. *Am J Clin Nutr*, 89:624–33.

MATEUCA RA; ROELANTS M; IARMARCOVAI G; AKA PV; GODDERIS L; TREMP A; BONASSI S; FENECH M; BERGE´-LEFRANC JL; KIRSCH-VOLDERS M (2008). hOGG1326, XRCC1399 and XRCC3241 polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Mutagenesis*, 23(1):35–41.

MATO JM; MARTÍNEZ-CHANTAR ML; LU SC (2008). Methionine Metabolism and Liver Disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 28:273–93.

McNULTY H; SCOTT JM (2008). Intake and status of folate and related B-vitamins: considerations and challenges in achieving optimal status. *British Journal of Nutrition*, 99(3):S48–S54.

- MENDOZA-NÚÑEZ VM; BERISTAIN-PÉREZ A; PÉREZ-VERA SP; ALTAMIRANO-LOZANO MA (2010). Age-related Sex Differences in Glutathione Peroxidase and Oxidative DNA Damage in a Healthy Mexican Population. *Journal of Women's Health*, 19(5):919-926.
- MILOŠEVIC-DJORDJEVIC O; GRUJICIC D; VASKOVIC Z; MARINKOVIC D (2010). High Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes of Untreated Cancer Patients Irrespective of Gender, Smoking and Cancer Sites. *Tohoku J. Exp. Med.*, 220:115-120.
- MORADI M; EFTEKHARI MH; TALEI A; FARD AR (2008). A comparative study of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in normal and breast cancer patients. *Public Health Nutrition*, 12(1):59–63.
- NOHMI T; KIM SR; YAMADA M (2005). Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutation Research*, 591:60–73.
- OBERLEY TD (2002). Oxidative Damage and Cancer. *American Journal of Pathology*, 160(2):403–408.
- OMIM – NCBI: Online Mendelian Inheritance in Man - National Center for Biotechnology Information. Home Page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- PAUL S; DE M (2010). Changes in Anti-Oxidant Enzyme Profile during Haematological Malignancy. *Int J Hum Genet*, 10(4): 247-250.
- POPLAWSKI T; ARABSKI M; KOZIROWSKA D; BLASINSKA-MORAWIEC M; MORAWIEC Z; MORAWIEC-BAJDA A; KLUPIŃSKA G; JEZIORSKI A; CHOJNACKI J; BLASIAK J (2006). DNA damage and repair in gastric cancer - A correlation with the *hOGG1* and *RAD51* genes polymorphisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 601(1-2):83-91.
- RADICELLA JP; DHERIN C; DESMAZE C; FOX MS; BOITEUX S (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* Proc. Natl. Acad. Sci., 94:8010–8015.
- RAJESWARI N; AHUJA YR; MALINI U; CHANDRASHEKAR S; BALAKRISHNA N; RAO KV; KHAR A (2001). Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis*, 22(4):679.
- RAJNEESH CP; MANIMARAN A; SASIKALA KR; ADAIKAPPAN P (2008). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J*, 49(8):640.
- RAY G; BATRA S; SHUKLA NK; DEO S; RAINA V; ASHOK S; HUSAIN SA (2000). Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 59:163–170.
- ROHAN TE; HARTWICK W; MILLER AB; KANDEL RA (1998). Immunohistochemical Detection of c-erbB-2 and p53 in Benign Breast Disease and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(17):1262-1269.
- ROSSNER JR P; TERRY MB; GAMMON MD; ZHANG FF; TEITELBAUM SL; ENG SM; SAGIV SK; GAUDET MM; NEUGUT AI; SANTELLA RM (2006). OGG1 Polymorphisms and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(4):811–5.

- SANJOAQUIN MA; ALLEN N; COUTO E; RODDAM AW; KEY TJ (2005). Folate intake and colorectal cancer risk: A meta-analytical approach. *Int. J. Cancer*, 113:825–828.
- SANTOS RA; TEIXEIRA AC; MAYORANO MB; CARRARA HHA; ANDRADE JM; TAKAHASHI CS (2009). Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. *Clin Exp Med*, 10:87–92.
- SANTOS RA; TEIXEIRA AC; MAYORANO MB; CARRARA HHA; ANDRADE JM; TAKAHASHI CS (2011). Variability in Estrogen-Metabolizing Genes and Their Association with Genomic Instability in Untreated Breast Cancer Patients and Healthy Women. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2011, Article ID 571784, 9 pages.
- SCHABATH MB; SPITZ MR; GROSSMAN HB; ZHANG K; DINNEY CP; ZHENG PJ; WU X (2003). Genetic Instability in Bladder Cancer Assessed by the Comet Assay. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(7):540-547.
- SELHUB J; MORRIS MS; JACQUES PF; ROSENBERG IH (2009). Folate–vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr*, 89(suppl):702S–706S.
- SEMMLER A; MATTHIAS SIMON M; MOSKAU S; LINNEBANK M (2008). Polymorphisms of methionine metabolism and susceptibility to meningioma formation. *J Neurosurg*, 108:999–1004.
- SEVEN A; ERBIL Y; SEVEN R; INCI F; GÜLYASAR T; BARUTCU B; CANDAN G (1998). Breast cancer and benign breast disease patients evaluated in relation to oxidative stress. *Cancer Biochem Biophys*, 16:333–345 (Abstract).
- SHAN X; AW TW; JONES DP (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac. Ther.*, 47:61-71.
- SINGH NP; MCCOY MT; TICE RR; SCHNEIDER EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175(1):184-91.
- SLUPPHAUG G; KAVLI B; KROKAN HE (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 531:231–251.
- SMITH AC; O'DONOVAN MR; MARTIN EA (2006). hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis*, 21(3):185–190.
- SMITH AD; KIM YI; REFSUM H (2008). Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr*, 87:517–33.
- SØRLIE T; PEROU CM; TIBSHIRANI R; AASF T; GEISLERG S; JOHNSEN H; HASTIEE T; EISENH MB; VAN DE RIJN M; JEFFREYJ SS; THORSENK T; QUISTL H; MATESEC JC; BROWNM PO; BOTSTEINC D; LØNNINGG PE; BØRRESEN-DALEB AL (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*, 98(19):10869–10874.
- SPEIT G (1995). Protocol for the application of the alkaline single cell gel test (SCG – Test or Comet – Assay) to detection of DNA damage in eukaryote cells. *Publicação Avulsa*.
- SPEIT G; SCHÜTZ P; BONZHEIM I; TRENZ K; HOFFMANN H (2004). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters*, 146(2):151-158.

- STOVER PJ (2004). Physiology of Folate and Vitamin B12 in Health and Disease. *Nutrition Reviews*, 62(6):S3-S12.
- SUH JR; HERBIG AK; STOVER PJ (2001). New perspectives on folate catabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 21:255–82.
- SYNOWIEC E; KRUPA R; MORAWIEC Z; WASYLECKA M; DZIKI L; MORAWIEC J; BLASIAK J; WOZNIAK K (2010). Efficacy of DNA double-strand breaks repair in breast cancer is decreased in carriers of the variant allele of the UBC9 gene c.73G>A polymorphism. *Mutation Research*, 694:31–38.
- TAS F; HANSEL H; BELCE A; ILVAN S; ARGON A; CAMLICA H; TOPUZ E (2005). Oxidative Stress in Breast Cancer. *Medical Oncology*, 22(1):11–15.
- TURRENS JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.*, 552(2):335–344.
- VOGEL U; NEXØ BA; OLSEN A; THOMSEN B; JACOBSEN NR; WALLIN H; OVERVAD K; TJØNNELAND A (2003). No Association between OGG1 Ser326Cys Polymorphism and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12:170–171.
- WAIBEL R; TREICHLER H; SCHAEFER NG; MUNDWILER DRSS; KUNZE S; KÜENZI M; ALBERTO R; NÜESCH J; KNUTH A; MOCH H; SCHIBLI R; SCHUBIGER PA (2008). New Derivatives of Vitamin B12 Show Preferential Targeting of Tumors. *Cancer Res*, 68(8):2904–2911.
- WASSON GR; MCKELVEY-MARTIN VJ; DOWNES CD (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*, 23(3):153–162.
- WEISS JM; GOODE EL; LADIGES WC; ULRICH CM (2005). Polymorphic Variation in hOGG1 and Risk of Cancer: A Review of the Functional and Epidemiologic Literature. *Molecular Carcinogenesis*, 42:127–141.
- WORSHAM MJ; RAJU U; LU M; KAPKE A; CHENG J; SANDRA L; WOLMAN R (2007). Multiplicity of Benign Breast Lesions Is a Risk Factor for Progression to Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 13(18):5474-5479.
- WU G; FANG YZ; YANG S; LUPTON JL; TURNER ND (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.*, 134:489–492.
- WU LL; WU JT (2002). Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clinica Chimica Acta*, 322:21–28.
- WU M; ZHANG Z; CHE W (2008). Suppression of a DNA base excision repair gene, hOGG1, increases bleomycin sensitivity of human lung cancer cell line Toxicology and Applied Pharmacology, 228(3):395-402.
- YANG X; YAN L; DAVIDSON NE (2001). DNA methylation in breast cancer, *Endocrine-Related Cancer*, 8:115–127.
- YU K; ZHANG J; ZHANG J; DOU C; GU S; XIE Y; MAO Y; JI C (2010). Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*, 18:370–378.
- ZHANG T; XIN R; GU X; WANG F; PEI L; LIN L; CHEN G; WU J; ZHENG X (2008). Maternal serum vitamin B12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. *Public Health Nutrition*, 12(5):680–686.

Ribeirão Preto, 16 de setembro de 2009

Ofício nº 3115/2009
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **“ESTUDO MOLECULAR E CITOGENÉTICO DE PACIENTES COM LESÕES MALIGNAS E PRÉ-MALIGNAS DE MAMA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 295ª Reunião Ordinária realizada em 14/09/2009, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 8603/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
FERNANDA PAULA DE CARVALHO
PROFª. DRª. CATARINA SATIE TAKAHASHI(Orientadora)
Depto. de Genética – FMRP-USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
LABORATÓRIO DE CITOGÊNETICA E MUTAGÊNESE**
Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP
CEP 14049-900 Tel: (16) 36023082

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estimada paciente, a Sra. está sendo convidada a participar de uma pesquisa sob a responsabilidade da pesquisadora Fernanda Paula de Carvalho.

**Telefones para contato: (16) 36023082 e (16) 81452601
E-mail: fe.carvalho@usp.br**

Nome da pesquisa: Estudo Molecular e Citogenético de pacientes com lesões malignas e pré-malignas de mama.

Por que está sendo feita a pesquisa (objetivo)?

Este trabalho procura entender se algumas mutações no DNA podem aumentar ou não as chances de se ter tumores benignos e malignos de mama;

Por que a Sra. é importante nesta pesquisa?

Você apresenta as condições que estão previstas para o desenvolvimento da pesquisa dentre as quais, a mais importante é o diagnóstico de tumor *maligno* mamário (carcinoma ductal);

O que tem que fazer para participar da pesquisa

Permitir que um profissional devidamente habilitado colete (tire) 20ml de seu sangue venoso (nas veias);

Qual o desconforto que terá ao participar da pesquisa

O desconforto é apenas o causado na hora de colher o sangue (tirar). Ocorre uma leve dor ao introduzir a agulha em sua veia;

Você terá algum risco se participar da pesquisa

O único procedimento ao qual será exposto é a colheita dos 20ml de sangue. O material utilizado para tirar seu sangue (seringa, agulha e luvas) é novo e limpo (estéril). É usado uma única vez e depois jogado (descartado) em lixo especial. Em alguns casos poderá haver extravasamento de sangue e formação de hematoma (no local onde introduziu a agulha fica roxo e inchado);

O que será feito com o seu sangue

Será enviado para o laboratório (onde faz os exames) onde serão realizados alguns testes usando as células sangüíneas. Após a realização dos testes as células recebem tratamentos especiais (esterilização) e são descartados. Os resultados dos exames, assim como as informações fornecidas serão sigilosas;

O que acontecerá se a Sra. não quiser participar desta pesquisa

Nada! Sua participação é livre (somente se você estiver de acordo);

Quais os benefícios desta pesquisa

Não há benefício direto para a senhora, porém após a realização dos testes, se verificarmos que as mutações genéticas estudadas podem influenciar nas chances de se ter tumores benignos e malignos mamários, futuramente a pesquisa poderá servir como novo parâmetro no diagnóstico e prevenção do câncer de mama, beneficiando muitas mulheres.

Fernanda Paula de Carvalho
Pesquisadora Responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu _____,
RG nº _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações
acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao tratamento;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem;
6. Que se existirem gastos adicionais, esses serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura da paciente

Identificação:

CADASTRO DE DOADORAS - PACIENTES

Data da entrevista: ____/____/____

Data da coleta de sangue: ____/____/____

Nº do prontuário:

DADOS PESSOAIS:

Nome completo:

Data de nascimento: ____/____/____

Idade:

Local de nascimento:

Nacionalidade: () Brasileiro () Estrangeiro - País: _____

Etnia: () Branco () Mestiço () Mulato () Negro () Índio () Oriental
() Outra: _____

DADOS PARA O CONTATO:

Cidade:

Estado:

Telefone (DDD + o número):

DADOS CLÍNICOS:

Telarca:

Menarca:

Menopausa:

Número de gestações:

Idade da 1º gestação:

HISTÓRIA DE CÂNCER NA FAMÍLIA DO PACIENTE

Grau de parentesco	Tipo de tumor

HISTÓRICO: TABAGISMO, ALCOOLISMO, MEDICAMENTOS E/ OU DROGAS

Tabagismo (tipo, a quanto tempo fuma, quantidade diária, etc):

Consumo de bebida alcoólica (tipo, a quanto tempo bebe, quantidade diária, etc):

Uso de medicamentos (tipo, frequência, finalidade, etc):

Uso de algum tipo de droga (tipo, frequência, etc):

FATORES DE RISCO

Uso de contraceptivos orais (início, fim, frequência, etc):

Tratamento hormonal (início, fim, frequência, etc):

CLASSIFICAÇÃO DO TUMOR (TNM)

Ano do tratamento:

Idade ao tratamento:

Nº de ciclos de quimioterapia:

DIAGNÓSTICO:

OUTRAS OBSERVAÇÕES (VIROSE, RAIO-X):