**MARILENE ALÍCIA SOUZA**

# Densidade mamária e polimorfismo do gene do receptor estrogênico em mulheres com mamas densas após a menopausa

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Prof. Dra. Angela Maggio da Fonseca

**SÃO PAULO**

**2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Marilene Alícia
Densidade mamária e polimorfismo do gene do receptor estrogênico em mulheres com mamas densas após a menopausa / Marilene Alícia Souza. -- São Paulo, 2012.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientadora: Angela Maggio da Fonseca.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Neoplasias da mama 3.Fatores de risco 4.receptores estrogênicos 5.Mamografia

USP/FM/DBD-312/12

## Dedicatória

Ao meu filho Victor Hugo,

Por todo amor, apoio que me deu.

Meu bem mais precioso.

Ao meu marido Pedro Hortense, pela enorme paciência,

preocupação e carinho durante todo este tempo.

A ele todo o meu amor.

Aos meus pais Jair de Souza e Maria Helena (in memoriam),

pelo amor incondicional,confiança, amizade, respeito

e por serem à base de tudo em minha vida.

## Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Angela Maggio da Fonseca, minha orientadora e amiga que tanto me ensinou e ajudou. Sua paciência e competência foram fundamentais para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, pelo apoio indispensável para idealização deste projeto e pelas informações preciosas neste trabalho.

Aos senhores minha eterna gratidão.

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr Bagnoli, por ser meu professor e pelo intenso apoio nesse trabalho.

Ao Dr. José Maria Soares, pelas preciosas orientações e por ter-me despertado o interesse pela genética.

Ao Dr. Nestor de Barros e equipe de radiologia, pelas imagens fornecidas que permitiram a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Qualificação de imagens médicas da Universidade Federal de São Paulo, por permitir a utilização dos equipamentos e, ao Dr Sílvio Ricardo Pires, pela ajuda na digitalização das imagens.

Aos colegas do ambulatório de Ginecologia Endócrina e Climatério,Joserita Serrano de Assis, Sandra Dircinha Teixeira de Araújo Moraes, Erica Mendonça das Neves, Wilson Maça Yuki Arie, Persio Yvo Adri Cezarino, Eliana Guimarães Labes, Ana Lucia Cavalcanti, pela amizade e respeito.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular (LIM 56): Dra Katia C Carvalho, Thiago H Gonçalves e Marinalva F Almeida, pela colaboração na extração do DNA e determinação dos polimorfismos.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia, por auxiliar-me no atendimento das pacientes.

Às pacientes, pela confiança e disponibilidade em participar do projeto.

Ao estatístico Prof. Dr. José Roberto Lauris, pela contribuição na analise e interpretação dos dados.

A amiga Dra Solange de Oliveira Braga Franzolin, pelo auxílio no entendimento dos dados estatísticos e por tornar esta difícil área tão mais simples.

Aos meus sogros Maria De Martin Hortense e Ideval Hortense, por todo cuidado, carinho e respeito que sempre tiveram por mim.

A toda a minha família e aos amigos que me apoiaram e me incentivaram a dedicar tantas horas à pesquisa.

A minha secretaria Roseli Tânia L Barbosa e enfermeira Cristiane Silva, pelo apoio e dedicação.

## Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com fomento recebido da FAPESP – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo

Processo: 2009/54563-0

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed.

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

# Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Resumo
Summary

1 INTRODUÇÃO ..... 1

2 REVISÃO DA LITERATURA ..... 3

2.1 Epidemiologia do câncer de mama ..... 3
2.2 Fatores de risco ..... 4
2.3 Densidade mamária e câncer de mama ..... 6
2.4 Anatomia da glândula mamária ..... 10
2.5 Densidade mamográfica ..... 11
2.6 Genética e câncer de mama ..... 13
2.7 Polimorfismos do gene do receptor estrogênico e densidade mamográfica .. 16
2.8 Polimorfismo SNPs *Pvull e Xbal* ..... 19
2.9 Microssatélite (*GT)n* ..... 25
2.10 Receptor estrogênico ..... 27

3 OBJETIVOS ..... 29

4 MÉTODOS ..... 30

4.1 Critérios de inclusão ..... 30
4.2 Critérios de exclusão ..... 31
4.3 Entrevista e exame físico ..... 31
4.4 Exames subsidiários de análise clínica ..... 31
4.5 Classificação das mamografias ..... 32
4.6 Determinação da densidade mamográfica ..... 33
4.7 Coleta de material biológico ..... 35
4.7.1 Extração do DNA de sangue periférico ..... 35
4.7.2 Quantificação do DNA ..... 36
4.7.3 Reação em cadeia de polimerase para o *íntron* 1 do gene do REα .... 36
4.7.4 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ..... 37

4.7.5 Determinação dos microssatélites *(GT)n* ..... 38
4.7.5.1 Reação de sequenciamento..... 38
4.7.5.2 Precipitação e purificação do produto da reação de sequenciamento com "Isopropanol" ..... 39
4.7.6 Controles internos do PCR ..... 41
4.7.7 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ..... 41
4.7.8 Distribuição dos Haplótipos ..... 42
4.8 Método Estatístico ..... 44

5 RESULTADOS ..... 45
5.1 Caracterização da densidade mamográfica..... 45
5.2 Características Clínicas..... 46
5.3 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ..... 48
5.4 Associação das características clínicas e polimorfismo do REα *Pvull, Xbal* ... 49
5.5 Associação das características clínicas e o polimorfismo de repetição (*GT*)n .... 59
5.6 Distribuição dos haplótipos ..... 66

6 DISCUSSÃO ..... 67
6.1 Fatores clínicos associados ao câncer de mama e densidade mamográfica... 68
6.2 Densidade mamográfica e polimorfismo do gene do receptor estrogênico ... 71

7 CONCLUSÕES ..... 79

8 ANEXOS ..... 81

9 REFERÊNCIAS ..... 102

APÊNDICES

## Lista de abreviaturas e símbolos

| | |
|---|---|
| ACR | American College of Radiology |
| Bi-RADS | Breast Imaging Reporting and Data System |
| CM | Câncer de Mama |
| DM | Densidade Mamográfica |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DGRs | Genes Reparadores do DNA |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| HDL | Lipoproteína de Alta Densidade |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IGF1 | Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 |
| IMC | Índice de Massa Corpórea |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| INRAD | Instituto de Radiologia |
| KD | Kilodalton |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Densidade |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| ml | Mililitro |
| ng | nanograma |
| OR | Odds Ratio |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |

| | |
|---|---|
| *Pvull* | Enzima de restrição que foi isolada da bactéria *Proteus vulgaris* |
| QualIM | Laboratório de Qualificação de Imagens Médicas |
| RE | Receptor Estrogênico |
| REα | Receptor Estrogênico alfa |
| REβ | Receptor Estrogênico beta |
| RFLP | *Restriction Fragment Length Polymorphism* |
| RNAm | Ácido Ribonucleico mensageiro |
| rpm | rotações por minuto |
| SNPs | S*ingle Nucleotide Polymorphisms* |
| STRs | *Short Tanden Repeats*- ou microssatélites |
| TH | Terapia Hormonal |
| TSH | Hormônio Estimulante da Tireoide |
| T3 | Triodotironina |
| T4 | Tiroxina |
| UDLT | Unidade Ducto-Lobular Terminal |
| µl | Microlitro |
| VLDL | Lipoproteína de muita baixa densidade |
| *Xbal* | Enzima restrição que foi isolada da bactéria *Xanthomonas badrii* |
| WHO | World Health Organization |

# Lista de Figuras


Figura 1. Taxas de mortalidade específicas por idade, câncer de mama feminina, por 100 mil mulheres. Brasil, 1995 a 2007 ..... 4

Figura 2. Combinação dos efeitos de proliferação celular (mitogênicos) e danos celulares causados por agentes genotóxicos (mutagênicos) podem sublinhar o aumento do risco de CM associado com alta DM. ..... 8

Figura 3. Idade, densidade mamária e câncer de mama ..... 9

Figura 4. Anatomia da glândula mamária. ..... 10

Figura 5. Representação dos quatro padrões de densidade mamográfica segundo a classificação do BI-RADS® ..... 12

Figura 6. Mecanismos envolvidos no controle da divisão celular..... 14

Figura 7. Receptores nucleares em ação..... 17

Figura 8. Estrutura dos domínios funcionais e descrição dos polimorfismos do gene receptor de estrogênio humano. ..... 18

Figura 9. Estrutura do receptor ..... 27

Figura 10. (a)mostra receptor estrogênico ligado ao DNA. (b) mostra a estrutura dimensional do REα e REβ ligado ao estradiol..... 27

Figura 11. Seleção da área mamária total pelo programa *Imaging J*..... 33

Figura 12. Seleção da área mamária de predominância fibroglandular, pelo programa *Imaging J* ..... 34

Figura 13. Perfil do DNA genômico extraído a partir de amostras de sangue das pacientes com mamas densas ..... 36

Figura 14. Fragmentos de PCR referentes ao *íntron* 1 do receptor de estrogênio alfa..... 37

Figura15. *Primer* da região promotora contendo os *tandem repeats GT* do gene do REα..... 38

Figura 16. Gráfico representativo do sequenciamento gênico da região promotora do receptor estrogênico alfa de paciente com mama densa. ..... 40

Figura 17. Diagramas esquemáticos de REα e o gene do receptor estrogênico 1 (ESR1). ..... 43

Figura 18. Distribuição da densidade mamográfica em 317 mulheres após a menopausa, determinada por dois observadores independentes. ..... 45

# Lista das Tabelas


Tabela 1. Risco relativo VS fatores de risco para desenvolvimento de câncer de mama ..... 5

Tabela 2. Padrões mamográficos segundo BI-RADS® ..... 11

Tabela 3. Genes de suscetibilidade ao CM e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem CM ..... 19

Tabela 4. Estudos de associação do polimorfismo do gene do REα-397 Pvull C/T com câncer de mama e/ou com fatores de risco para a doença..... 23

Tabela 5. Estudos de associação do polimorfismo do gene do REα-351 Xbal A/G com câncer de mama e/ou com fatores de risco a doença..... 24

Tabela 6. Frequência do alelo polimórfico (GT)n do REα em casos de câncer de mama e em controles sadios ..... 26

Tabela 7. Classificação das Mamografias segundo BI-RADS® ..... 32

Tabela 8. Grau de concordância entre os dois observadores na determinação da densidade mamográfica, segundo os índices de correlação de *McNemar* ..... 46

Tabela 9. Descrição das variáveis quantitativas..... 46

Tabela 10. Descrição das variáveis qualitativas..... 47

Tabela 11. Distribuição dos polimorfismos com verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ..... 48

Tabela 12. Distribuição dos polimorfismos (GT)n ..... 49

Tabela 13. Associação entre polimorfismo *Pvull* e cor..... 50

Tabela 14. Associação entre polimorfismo *Xbal* e cor ..... 50

Tabela 15. Associação entre polimorfismo *Pvull* e número de partos..... 51

Tabela 16. Associação entre polimorfismo *Xbal* e número de partos..... 51

Tabela 17. Associação entre polimorfismo *Pvull* e idade da menopausa ..... 52

Tabela 18. Associação entre polimorfismo *Xbal* e idade da menopausa ..... 52

Tabela 19. Associação entre polimorfismo *Pvull* e idade ao nascimento do primeiro filho ..... 53

Tabela 20. Associação entre polimorfismo *Xbal* e idade ao nascimento do primeiro filho ..... 53

Tabela 21. Associação entre polimorfismo *Pvull* e idade da menarca..... 54

Tabela 22. Associação entre polimorfismo *Xbal* e idade da menarca..... 54
Tabela 23. Associação entre polimorfismo *Pvull* e hábito de fumar ..... 55
Tabela 24. Associação entre polimorfismo *Xbal* e hábito de fumar ..... 55
Tabela 25. Associação entre polimorfismo *Pvull* e ingestão de bebida alcoólica .... 56
Tabela 26. Associação entre polimorfismo *Xbal* e ingestão de bebida alcoólica ..... 56
Tabela 27. Associação entre polimorfismo *Pvull* e antecedente familiar (AF) ..... 57
Tabela 28. Associação entre polimorfismo *Xbal* e antecedente familiar (AF) ..... 57
Tabela 29. Associação entre polimorfismo *Pvull* e Índice de Massa corpórea (IMC)..... 58
Tabela 30. Associação entre polimorfismo *Xbal* e Índice de Massa corpórea (IMC)..... 58
Tabela 31. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e cor..... 59
Tabela 32. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e número de partos..... 60
Tabela 33. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15, (*GT*)16 e Idade da menopausa..... 61
Tabela 34. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e idade ao nascimento do 1º filho ..... 62
Tabela 35. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e idade da menarca..... 63
Tabela 36. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e hábito de fumar ..... 64
Tabela 37. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e ingestão de bebida alcoólica ..... 64
Tabela 38. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e antecedentes familiares (AF) ..... 65
Tabela 39. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e Índice de Massa corpórea (IMC) ..... 65
Tabela 40. Frequência dos haplótipos *Pvull* x *Xbal* ..... 66
Tabela 41. Frequência *REα*-397 *Pvull C/T* neste e em outros estudos ..... 74
Tabela 42. Frequência do *REα*-351 *Xbal A/G* neste e em outros estudos..... 75

# Resumo

Souza MA. *Densidade mamária e polimorfismo do gene do receptor estrogênico em mulheres com mamas densas após a menopausa* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 115p.

**Introdução:** Polimorfismo é variação genética de ocorrência habitual na população em geral, encontrado em frequência superior a 1%. Há vários polimorfismos conhecidos no gene do receptor estrogênico alfa, alguns dos quais podem modificar a função do receptor e a ação dos estrogênios. Associação de polimorfismos no gene do receptor estrogênico alfa e risco de doenças, incluindo o câncer de mama, tem sido objeto de grande interesse, porém existem poucos estudos publicados sobre a prevalência destes na população brasileira. **Objetivos:** Verificar em mulheres com mamas densas após a menopausa; 1) A distribuição dos fatores de risco para câncer de mama; 2) A frequência dos polimorfismos do gene do receptor estrogênico alfa *Pvull, Xbal e (GT*)n; 3) A associação entre os resultados moleculares e os fatores de risco para o câncer de mama. **Casuística e métodos:** Estudo observacional realizado na divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 308 mulheres com idade entre 45 e 65 anos, mamas densas, que estavam há pelo menos um ano sem menstruar, que não faziam uso de terapia hormonal há 1 ano ou mais e sem antecedente pessoal de câncer de mama e ovário. Caracterizaram-se na história clínica e no exame físico, idade da menarca e da menopausa, paridade, idade ao nascimento do primeiro filho, antecedentes familiares de câncer de mama, hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica e o Índice de Massa Corpórea. Foi coletada amostra de sangue periférico para extração do DNA genômico e determinação dos polimorfismos presentes no *intron 1 (Pvull e Xbal)* e na região promotora do *éxon 1 (GT)n* e dosagens de glicemia, colesterol total e frações, insulina, IGF1, TSH, T3, T4, FSH, LH e estradiol. **Resultados:** Os fatores considerados de risco para o câncer de mama, menarca antes dos 12 anos (35,38%), nuliparidade ou idade ao ter o 1º filho após os 28 anos (41,66%), história familiar de câncer de mama (19,16%) e sobrepeso/obesidade (62,01%) foram mais prevalentes nessa população. A cor branca foi a mais frequente, coincidindo com os resultados de outros estudos, e a menopausa tardia não se mostrou um fator de influência nessa população. As frequências alélica e genotípica para os SNPs no REα-397-*Pvull* e *Xbal* foram: P=43,99%; p=56,01%; *pp*=32,14%, *Pp*=47,73% e *PP*=20,13%; *X*=41,56%, *x*= 58,44%; *xx*=33,44%, *Xx*=50,00% e *XX*=16,56%, respectivamente. Para o polimorfismo de repetição STRs *(GT)n,* os genótipos mais frequentes foram 14, 15 e 16, com predomínio da repetição 16. As distribuições alélica e genotípica dos polimorfismos (*Pvull, Xbal e GTn*), não sofreram influências significativas dos fatores de risco pesquisados. **Conclusão:** Os fatores de risco para o câncer de mama foram mais prevalentes nessa população de mulheres com mamas densas, embora, não tenham mostrado associações significativas com os polimorfismos estudados. Estudos caso controle adicionais são necessários para melhor compreender a associação destes polimorfismos e o câncer de mama.

**Descritores:** 1.Polimorfismo genético 2.Neoplasias da mama 3.Fatores de risco 4.Receptores estrogênicos 5.Mamografia

# Summary

Souza MA. *Breast density and polymorphism of the estrogen receptor gene in women with hight breast density after menopause* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 115p

**Introduction:** Polymorphism is genetic variation of usual occurrence in the general population, found with frequency higher than 1%. There are several known polymorphisms in the estrogen receptor alpha (ERα), some of which can modify the receptor function and the action of the estrogen. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of diseases, including breast cancer, has been a subject of great interest, but there are few published studies on the prevalence of these in the Brazilian population. **Objective:** Checking on women with high breast density after menopause; 1) the distribution of risk factors for breast cancer; 2) the frequency of polymorphism of the estrogen receptor alpha gene *Pvull*, *Xbal* and (GT)n; 3) the association between the molecular results and the risk factors for breast cancer. **Methods:** Observational study carried out in the Gynecology Department of the *Hospital das Clínicas* of Medical School of São Paulo University, in 308 women aged between 45 and 65 years-old, high breast density, who were at least one year without menstruating and did not use hormone therapy for 1 year or more and no personal history of breast and ovarian cancer. It was characterized on clinical history and physical examination: age of menarche and menopause, parity, age at birth of first child, family history of breast cancer, smoking, alcohol intake and body mass index. Peripheral blood sample was collected for DNA extraction and determination of genomic polymorphisms present in the intron 1 (Pvull and Xbal), in the promoter region of exon 1 (GT)n, dosages of blood glucose, total cholesterol and fractions, insulin, IGF1, TSH, T3, T4, FSH, LH, and estradiol. **Results:** The factors considered of risk for breast cancer, menarche before age 12 (35.38%), nulliparity or first child after the 28 years-old (41.66%), family history of breast cancer (19.16%) and Overweight/obesity (62.01%) were more prevalent in this population. The Caucasian were the most frequent, coinciding with the results of other studies, and late menopause was not a factor of influence in this population. The allele and genotypic frequencies for SNPs in ERα-397-Pvull and Xbal were: P = 43.99%; p = 56.01%; pp = 32.14%, Pp = 47.73% and PP = 20.13%; X = 41.56%, x = 58.44%; xx = 33.44%, Xx = 50.00% and XX = 16.56%, respectively. For the STRs repeat polymorphism (GT)n, the most common genotypes were 14, 15 and 16, with a predominance of repeat 16. The allele and genotypic distributions of polymorphisms (Pvull, Xbal and GTn), did not suffer significant influences of the risk factors surveyed. **Conclusion:** The risk factors for breast cancer were more prevalent in this population of women with high breasts density, although have not shown significant associations with polymorphisms studied. Additional studies case-control are needed to better understand the Association of these polymorphisms and breast cancer.



**Descriptors:** 1.Genetic polymorphism 2.Breast neoplasms 3.Risk factors 4.Estrogenic receptors 5.Mammography

# 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1 milhão de casos novos de câncer de mama (CM) em todo o mundo, o que o torna o câncer mais comum entre as mulheres. A cada ano, 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (WHO, 2012).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012), não tem sido diferente. Em 2012, esperam-se 52.680 casos novos de câncer de mama, ou seja, risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Ainda, de acordo com o INCA, na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais prevalente entre as mulheres, com risco estimado de 69 casos novos por 100 mil mulheres. Excluindo-se os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (65/100.000), Centro-Oeste (48/100.000) e Nordeste (32/100.000). Na Região Norte é o segundo tumor mais prevalente (19/100.000) (INCA 2012).

Diante desses números, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de identificar a população de maior risco para CM, e, desta forma, promover ações de políticas públicas para sua prevenção e detecção precoce.

O estudo da densidade mamográfica (DM), em particular, assume importância, pois é considerada relevante fator de risco independente para o CM (Vachon et al., 2000; Byrne et al., 1995).

A DM depende da distribuição dos elementos que a constitui: ductos, alvéolos, estruturas fibrosas e gordura, cujas proporções sofrem influências genéticas e ambientais. Estudos em gêmeos demonstram que a hereditariedade resulta em 60% da DM (Ursin et al., 2009).

Modificações nos genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese, ação e metabolização dos esteróides sexuais, podem contribuir para o desenvolvimento de

alterações em vários tecidos hormônio dependentes e, também, explicar as variações individuais na DM (van Duijnhoven et al., 2006; Cai et al., 2003[A]; Haiman et al., 2003).

O estudo dos polimorfismos em genes de baixa penetrância (associados previamente a aumento de risco para CM) em mulheres com mamas densas após a menopausa motivou este trabalho.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

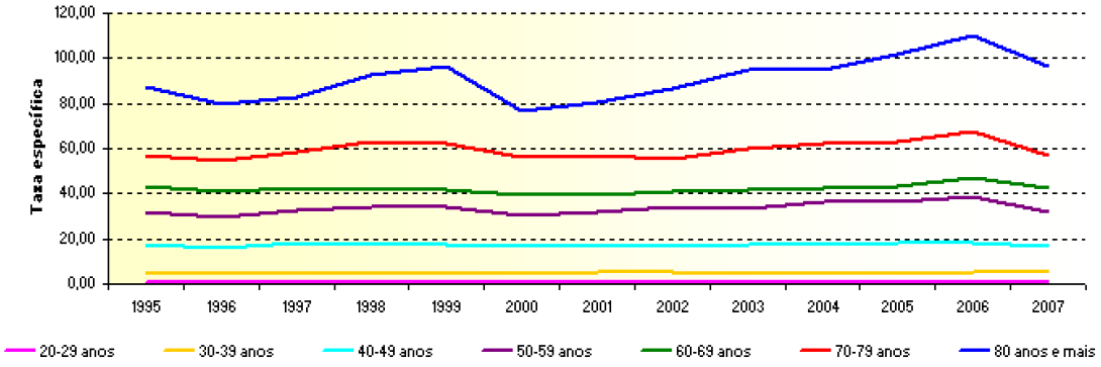
## 2.1 Epidemiologia do câncer de mama

Atualmente o CM é um problema de saúde pública, não apenas em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, mas também em países desenvolvidos, como os Estados Unidos e países da Europa Ocidental. Tal situação deve-se à dificuldade de prevenção primária (eliminar fatores de risco ou diagnosticar e tratar lesões precursoras) e, como consequência, observa-se um aumento significativo na incidência e mortalidade decorrentes desta neoplasia. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), observou-se, nas décadas de 60 e 70, aumento de dez vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes.

O aumento na incidência pode ser explicado, em parte, por alterações nos hábitos reprodutivos, como postergação do primeiro parto, e nutricionais (considerando que a obesidade eleva o risco de câncer após a menopausa) (Harvey e Bovbjerg, 2004).

No Brasil, o CM também apresenta alta incidência entre as mulheres. Segundo o INCA, para uma população feminina de 93 milhões, estima-se que ocorram 52.680 casos novos em 2012, com incidência de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Tanto a incidência como a taxa bruta de mortalidade vêm apresentando aumento significativo nas últimas décadas (IBGE, 2012). A mortalidade proporcional por câncer em mulheres, mostram que os óbitos por câncer de mama ocupam o primeiro lugar no país, com 15,2%. Esse padrão é semelhante nas diferentes regiões brasileiras, com exceção da região Norte, onde os óbitos por câncer de mama ocupam o segundo lugar, com 10,8%. Os maiores percentuais na mortalidade proporcional por câncer de mama são os do Sudeste (16,6%) e Sul (14,7%), seguidos das regiões Nordeste (13,6%) e Centro-Oeste (13,3%) (BRASIL. Datasus/SIM, 2012).

O câncer de mama é raro antes dos 40 anos e a partir dessa idade a incidência tende a crescer progressivamente. A mortalidade também aumenta progressivamente com a idade, conforme dados para o Brasil apresentados na figura 1 (BRASIL. Datasus/SIM, 2012).




FONTE: INCA – Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama, 2012.

**Figura 1. Taxas de mortalidade específicas por idade, câncer de mama feminina, por 100 mil mulheres. Brasil, 1995 a 2007**

Entre as principais capitais do país, as estatísticas mostram São Paulo com 5.760, Rio de Janeiro com 4.190 e Belo Horizonte com 1.000 casos novos, que são os locais onde a incidência do CM é maior. Tal fato deve-se, além da maior prevalência de fatores de risco nessas cidades, ao atendimento de pacientes advindas de cidades do interior e mesmo de alguns estados do Norte e Nordeste.

## 2.2 Fatores de risco

O CM é uma doença heterogênea e fatores de risco podem ser diferentemente associados com o desenvolvimento de distintos subtipos de tumores com comportamento biológico e prognóstico diferente.

História familiar é um importante fator de risco, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de

idade. Entretanto, o CM de caráter familiar corresponde aproximadamente a 10% de todos os casos (Sherr, 2004).

A idade constitui outro importante fator de risco, e a taxa de incidência apresenta curva ascendente a partir dos 25 anos e concentra a maioria dos casos na faixa etária acima dos 45 anos (Jensen e Jordan, 2003).

Fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do CM tais como: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos e menopausa tardia após os 50 anos de idade (Tabela 1).

**Tabela 1. Risco relativo VS fatores de risco para desenvolvimento de câncer de mama**

| Risco Relativo | Fator de Risco |
|---|---|
| RR > 4,0 | Sexo feminino |
| | Densidade mamária aumentada |
| | Dois familiares de 1º grau com câncer de mama antes dos 40 anos |
| | Idade > 65 anos |
| | Mutações de BRCA 1 e BRCA 2 |
| | História pessoal de câncer de mama |
| | Hiperplasia com atipias |
| RR = 2,1 – 4,0 | Um familiar de 1º grau com câncer de mama antes dos 40 anos |
| RR = 1,1 – 2,0 | |
| - Fatores Hormonais | 1ª Gestação após os 30 anos<br>Menarca precoce e menopausa tardia<br>Nuliparidade<br>Uso recente de anticoncepcional oral ou Terapia Hormonal<br>Obesidade |
| - Outros Fatores | Uso de álcool |
| | História pessoal de câncer de cólon, endométrio e ovário |
| | Dieta gordurosa |
| | Baixo consumo de vegetais |

FONTE: ACS - American Cancer Society , 2012.

Obesidade e dieta inadequada (alta ingestão de gordura e baixa quantidade de fibras) são ligadas ao aumento do risco de CM desde os anos 70 (Waard e Baanders, 1974). Ganho de peso durante a vida adulta é associado ao aumento de risco de CM principalmente após a menopausa (Pichard et al., 2008). Von Drygalski et al., em 2011, encontraram taxas de sobrevida com diferenças significativas quanto ao Índice de Massa Corpórea. Sobrevida média após o diagnóstico ou tempo médio de aparecimento de metástase para paciente com IMC≤ 30 e >30 foi de 7,1 (IC= 4,4 – 8,7) e 3,2 anos (IC=2,41 - 6,75), respectivamente.

A ingestão de álcool, mesmo que em quantidade moderada, é identificada como fator de risco para o CM, assim como a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 35 anos (Harvey e Bovbjerg, 2004).

## 2.3 Densidade mamária e câncer de mama

O estudo da DM assume particular interesse, pois é considerado relevante fator de risco independente para o CM. Várias publicações mostram associação positiva (Wolfe, 1976; Saftlas e Szklo, 1987; Martin e Boyd, 2008; Woolcott et al., 2009; Sprague et al., 2012).

Em 1976, Wolfe foi o primeiro que propôs a associação entre DM e risco de CM. Ele encontrou relação de 37:1 para mamas extremamente densas, quando comparadas às mamas adiposas. Entretanto, como seus achados não foram reproduzidos em estudos de prevalência, questionou-se esta associação.

Em 1987, Saftlas e Szklo revisaram os estudos realizados até aquela data, cujos critérios foram os de Wolfe, e concluíram que os estudos que foram cuidadosamente conduzidos sustentavam a associação de risco e que o principal fator de resultados conflitantes foi a perda de consistência em aplicar esses critérios.

No começo de 1980, com o surgimento de mamógrafos mais aprimorados, a DM pôde ser melhor avaliada. Harvey e Bovbjerg, 2004, em revisão sistemática, observaram

associação da DM com o risco de CM usando métodos quantitativos. Os achados desta revisão mostraram moderada para forte associação entre risco de CM e alta DM.

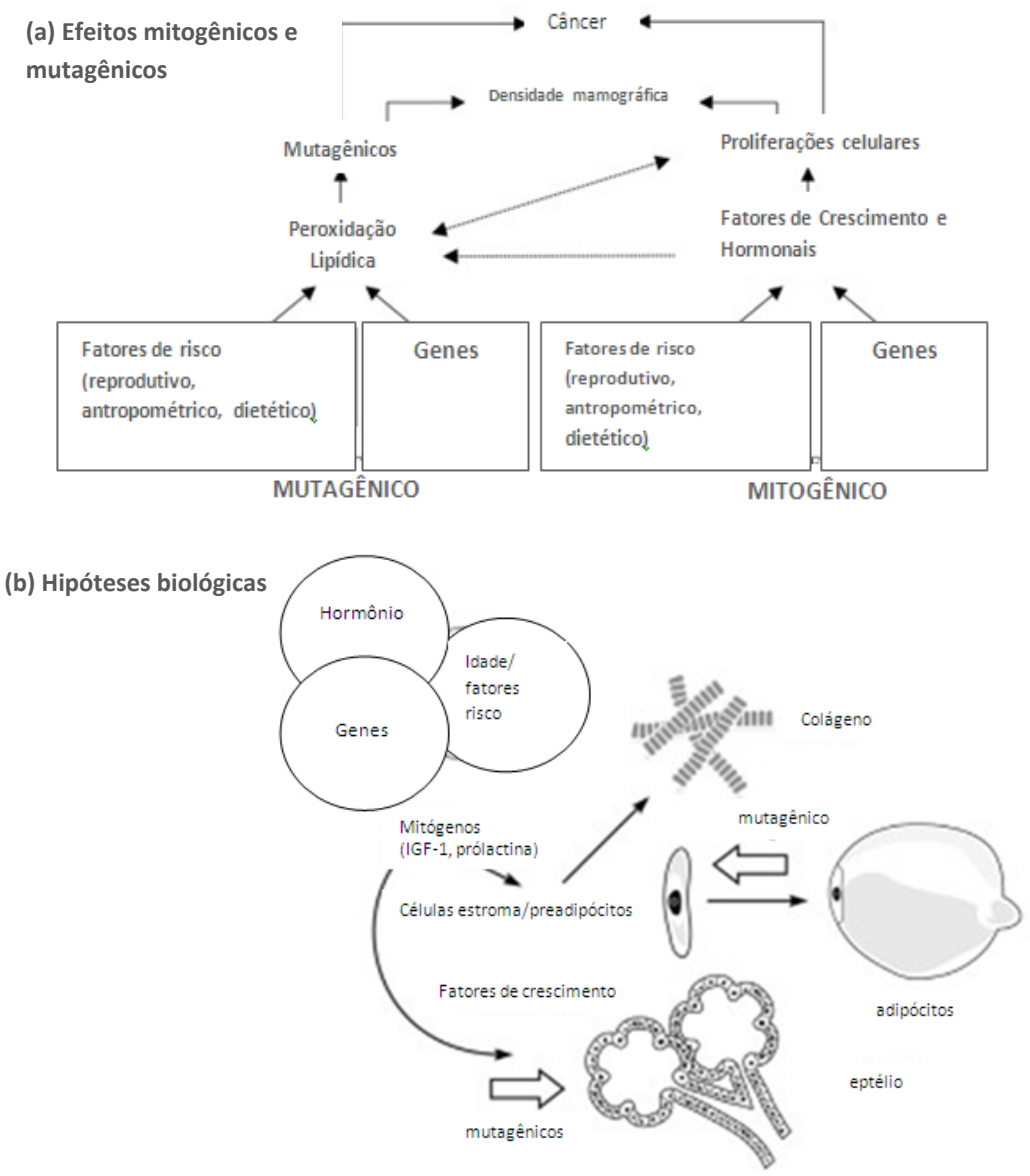
Byrne et al. 1995, verificaram que a mama densa era fator de risco independente para o CM, após ajustamento para outros fatores de risco tais como: história familiar, idade do nascimento do primeiro filho, nuliparidade e uso de terapia hormonal. Mulheres com mamas extremamente densas apresentavam risco cinco vezes maior para desenvolvimento dessa doença.

Sala et al. 2001, observaram associação positiva entre tumores mamários de alto grau histológico e alta DM, usando os critérios de Wolfe.

Altas taxas de DM são comuns nos dias atuais, 50% das mulheres com idade entre 40 a 49 anos e 30% das mulheres com idade entre 70 a 79 anos possuem mamas com 50% ou mais de tecido fibroglandular (Stomper et al., 1996). Nesse mesmo sentido, Blane et al., 2002, afirmaram que CM atribuível ao tecido mamário denso pode se tornar mais prevalente no futuro. Os autores observaram que a DM obtida pelas mamografias nos anos 90 não declinavam tão rapidamente como aquelas obtidas nos anos 80 e verificaram que as causas desse aumento podem ser devido a fatores como: postergação da primeira gestação, dieta inadequada e nuliparidade, tornando os fatores de risco para CM cada vez mais significantes em nossa população. Harvey e Bovbjerg, após revisão da literatura, afirmaram que somente anormalidades genéticas, idade, câncer de mama anterior e biopsia de mama com achados de carcinoma *in situ* são associados com similar ou maior risco relativo de CM, quando comparados à DM.

Woolcott et al. 2009, mostraram que mulheres com tecido fibroglandular ocupando mais que 75% de toda área mamária, têm quatro a seis vezes mais risco de desenvolver CM que mulheres com mamas adiposas.

Martin e Boyd, em 2008, propuseram que a exposição acumulativa à alta DM poderia ser importante determinante da incidência de CM e que o risco de CM associado à DM pode ser explicado pela combinação de efeitos mitogênicos (os quais influenciam a proliferação celular e do tamanho da população de células na mama), e efeitos mutagênicos (os quais provocam provavelmente danos genéticos naquelas células), figura 2.



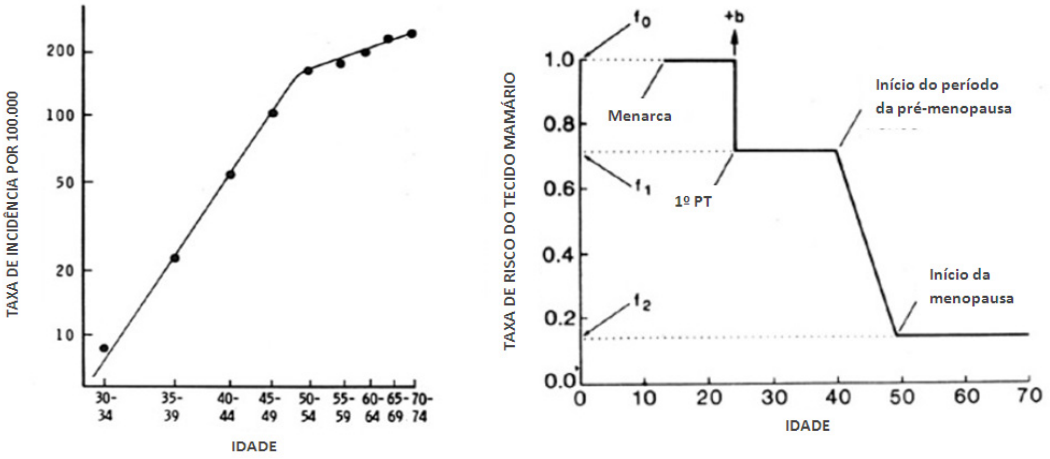

FONTE: Martin e Boyd,2008.

**Figura 2. (a) Combinação dos efeitos de proliferação celular (mitogênicos) e danos celulares causados por agentes genotóxicos (mutagênicos) podem sublinhar o aumento do risco de CM associado com alta DM. Aumento da proliferação celular amplia a susceptibilidade para mutações, mas também eleva a peroxidação lipídica, a qual pode aumentar novamente a proliferação celular. (b) Os componentes do tecido (células epiteliais, celulas estromais, colágeno e gordura) que são responsáveis pela variação na DM são ligados um ao outro. Fibroblastos do estroma produzem colágeno. Células estromais e epiteliais são influenciadas por fatores de crescimento parácrinos e endócrinos (mitogênicos). Danos genéticos em células do estroma ou em células epiteliais causadas por agente mutagênicos podem iniciar a carcinogênese**

Boyd et al. 2010, em revisão da literatura, concluíram que a DM é fortemente associada com aumento de risco de CM invasivo (OR= 3,58 IC95% 2,3-5,7), carcinoma *in situ* (OR= 2,9 IC95% 1,4-5,9) e com lesões proliferativas precursoras de CM.

A DM declina com o aumento da idade, no entanto a incidência CM aumenta. Isto parece paradoxal, porém pode ser explicado pelo modelo proposto por Pike et al. 1983. De acordo com este modelo, o que é relevante para o aumento do CM é o tempo em que o tecido mamário fica exposto à alta DM durante a vida (Figura 3). As taxas de proliferação do tecido mamário são mais rápidas no tempo da menarca, diminuem com a gravidez e perimenopausa e são mais lentas após a menopausa.

**Incidência do CM e tempo em que o tecido mamário está exposto à alta DM de acordo com o modelo de Pike**

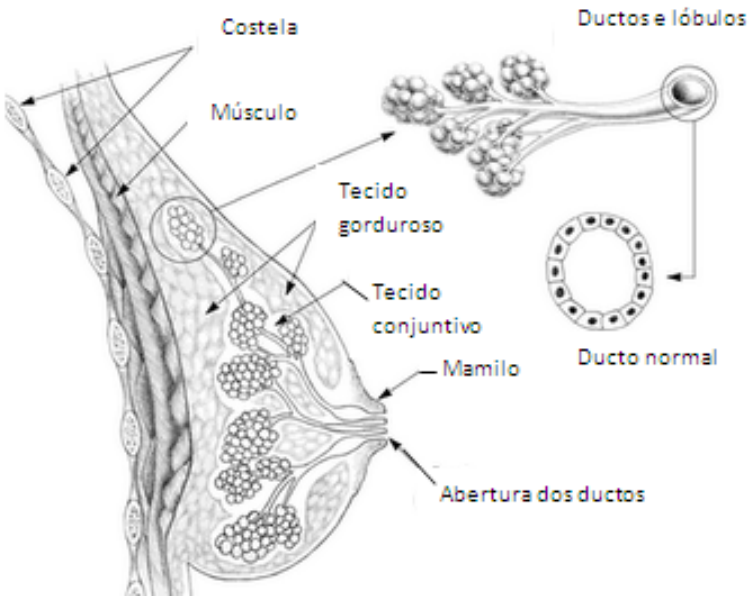



FONTE: Martin e Boyd , 2008.

**Figura 3. A esquerda mostra a idade específica da incidência do CM. Adaptado de Pike et al. À direita, o modelo de Pike onde se vê o tempo em que o tecido mamário está exposto à DM. 'b' representa o tempo de exposição à maior proliferação celular (e maior DM) terminando com a primeira gravidez a termo**

## 2.4 Anatomia da glândula mamária

A mama, glândula sudorípara modificada, é composta de 15 a 20 lobos ramificados. Cada lobo contém numerosos lóbulos e pequenos ductos ramificados que progressivamente se unem para constituir ductos maiores e, finalmente, um único subareolar principal. Em direção oposta, esses ductos terminais finalizam-se em pequenas dilatações, originando 10 a 100 alvéolos e a esse conjunto terminal da-se a denominação de lóbulo mamário. Este segmento ducto-lobular terminal (UDLT) representa a unidade funcional mamária, do qual a maioria dos cânceres se origina (Baracat et al., 1998). Servindo de sustentação às estruturas epiteliais, encontra-se o tecido conjuntivo, que é altamente celular e vascularizado (Figura 4). A quantidade de UDLT é dependente da idade e influência hormonal. A mama madura sofre trocas cíclicas durante o ciclo menstrual. Estrogênios aumentam a proliferação celular e a progesterona intensifica este efeito. Há também aumento do volume mamário e conteúdo de água durante a fase luteal do ciclo. Aguda deprivação do estrogênio e progesterona causam aceleração da morte celular, ou apoptose, havendo, portanto, diminuição da DM durante a menstruação (Harvey e Bovbjerg, 2004).




FONTE: Modificado de Moore et al. 2011.

**Figura 4. Anatomia da glândula mamária**

Durante o período da perimenopausa, o ciclo menstrual encurta, com nível de estradiol maior do que nos anos anteriores, enquanto que as taxas de progesterona continuam similares. Cistos mamários são mais comuns entre a idade de 40 a 49 anos possivelmente devido ao encurtamento da fase folicular e elevado nível de estrogênios, durante esse tempo (Stomper et al., 1996).

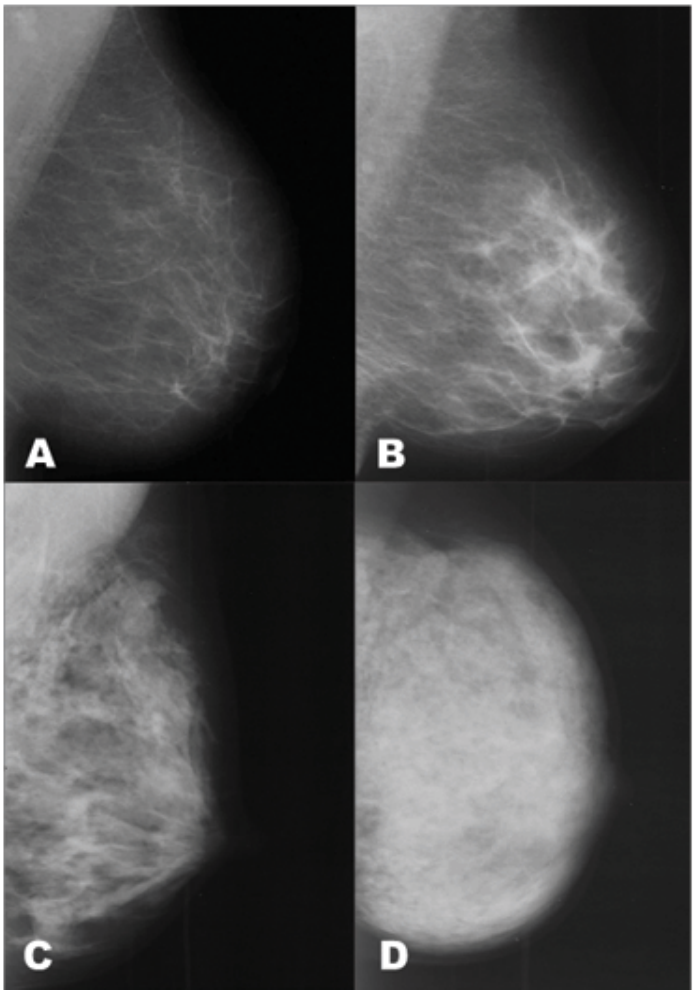
Com a redução do nível de estrogênio e progesterona após a menopausa, o ciclo de proliferação celular torna-se quiescente. O tecido lobular regride enquanto a porção mais proximal do sistema ductal permanece. Essa involução não é uniforme, podendo produzir assimetrias mamográficas e ultrassonográficas.

## 2.5 Densidade mamográfica

A DM é resultado da porcentagem de tecido fibroglandular que compõe a mama, a qual é formada por quantidade variável de tecido adiposo, conjuntivo e epitelial (Tabela 2 e Figura 5). Dependendo da composição histológica da mama, observam-se duas DM: *densidade de gordura*, que reflete a quantidade de tecido adiposo e *densidade de água*, que reflete o conteúdo de tecido conjuntivo e epitelial da mesma. A densidade de gordura é evidenciada à mamografia pela hipertransparência (escuro) e radiolucência, enquanto a densidade de água é evidenciada pela hipotransparência (Boyd et al., 2010).

**Tabela 2. Padrões mamográficos segundo BI-RADS®**

| Padrões mamográficos |
|---|
| *Padrão 1:* mamas predominantemente adiposas, com menos de 25% de tecido fibroglandular (radiotransparente devido à alta proporção de gordura). |
| *Padrão 2:* mamas parcialmente lipossubstituídas, com 25 a 50% de tecido fibroglandular. |
| *Padrão 3:* mamas heterogeneamente densas (densidade fibroglandular de aspecto nodular ocupando de 50 a 75% do volume mamário). |
| *Padrão 4:* mamas extremamente densas, com parênquima homogêneo ocupando mais de 75% do volume mamário. |




FONTE: Ramos et al. 2006.

**Figura 5. Representação dos quatro padrões de densidade mamográfica segundo a classificação do BI-RADS®**

A formação da imagem radiológica da mama resulta da superposição destes tecidos, visualizados à mamografia pelas diferentes densidades. Quanto maior a quantidade de gordura da mama, menor será a DM, ao passo que a maior proporção de tecido conjuntivo e epitelial aumenta a densidade radiológica da mama. A imagem radiológica que se forma é conhecida como *padrão mamográfico* (Tabela 2).

Em 2003, o *American College of Radiology* (ACR), por meio do léxico BIRADS® (*Breast Imaging Reporting and Data System*), atualizou e classificou os padrões mamográficos.

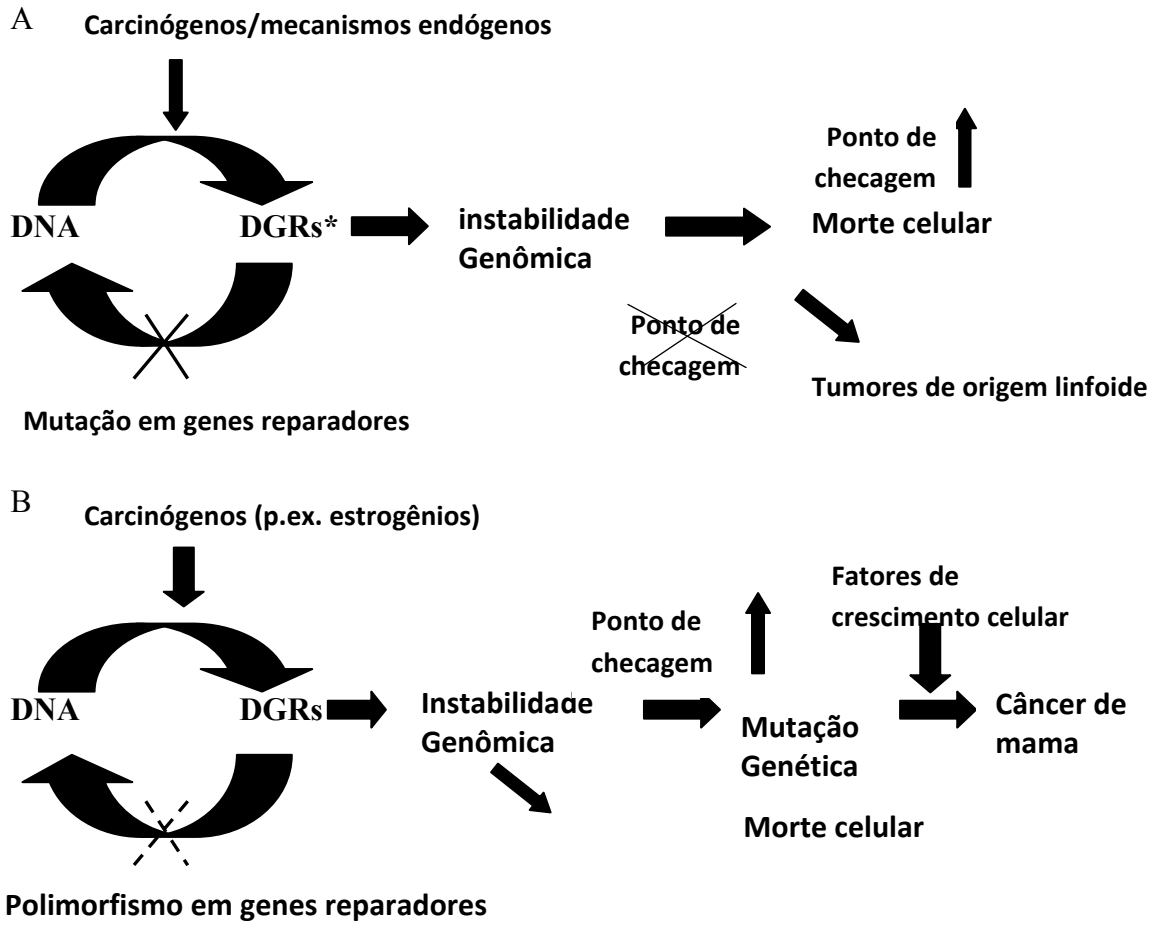
Estudos em gêmeos demonstraram que a hereditariedade resulta em 60% da DM (Ursin et al., 2009; Boyd et al., 2010).

Existem grandes variações nas mamas em uma mesma mulher, de acordo com fatores que possam modificar a proporção dos seus elementos, tais como: idade, paridade, tipo físico e estado hormonal. Em jovens, habitualmente, as mamas têm consistência firme e são de forma cônica, são geralmente densas e sofrem, progressivamente, involução com o decorrer da idade, aumentando o tecido adiposo e diminuindo o tecido epitelial, estromal e lobular. Essa involução mamária, no entanto, não é padrão em todas as mulheres. Algumas ainda mantêm padrão mamográfico denso, com predomínio de tecido fibroglandular. Stomper et al, 1996, encontraram 36% de mamas densas em mulheres com idade entre 55 a 59 anos e 30%, em mulheres entre 75 a 79 anos.

## 2.6 Genética e câncer de mama

As neoplasias malignas surgem em decorrência de alterações no código genético, as quais conferem vantagens de crescimento às células alteradas conduzindo-as à formação de tumores e, posteriormente, à metastatização; resultado do acúmulo progressivo de modificações no DNA, como observado na figura 6 (Wu e Shen, 2011).

As primeiras evidências de que o câncer é uma doença genética vieram de exames microscópicos de células tumorais, nos quais foi verificada a presença de uma série de alterações na estrutura dos cromossomos. No entanto, somente nas últimas décadas, com o avanço das técnicas de manipulação do DNA e detecção de mutações, os genes afetados por esses rearranjos cromossômicos puderam ser identificados. Nesse sentido, o estudo das bases moleculares da formação e progressão dos tumores gerou o conceito de que o câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo progressivo de mutações somáticas em genes que codificam proteínas envolvidas na regulação da proliferação celular (Wu e Shen 2011).




FONTE: Wu e Shen, 2011.

**Figura 6. Mecanismos envolvidos no controle da divisão celular**

Os mecanismos moleculares envolvidos nas neoplasias malignas da mama são complexos e compreendem alterações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Enquanto os proto-oncogenes regulam positivamente o ciclo celular, os genes supressores de tumor desempenham o papel regulatório negativo na proliferação das células. Mutações nesses genes podem ter efeito recessivo ao nível celular, com perda de função, ou efeito dominante-negativo, no qual a proteína mutante inativa a proteína normal (Bishop, 1991).

As mutações podem ocorrer tanto em células de linhagem germinativa (câncer hereditário), quanto em células somáticas (câncer esporádico). Noventa por cento dos

CM são esporádicos, sem nenhum caráter familiar. Portanto, apesar de o câncer ser considerado uma doença genética, ele não é necessariamente uma doença hereditária.

A análise de famílias com vários casos de CM e câncer de ovário levou à identificação de genes de alto risco que inclui BRCA1, BRCA2, TP53 e PTEN. Indivíduos que apresentam mutações nesses genes de linhagem germinativa possuem risco elevado de desenvolver o câncer em idade precoce (antes da menopausa) e são, geralmente, receptor estrogênico negativo. A suscetibilidade desses genes na população em geral é rara (Pharoah et al., 2008).

No entanto, a maioria dos casos de CM não é explicada por alterações em genes de alta penetrância, mas sim, por alterações mais prevalentes, embora de baixa penetrância, sendo também chamados de genes de suscetibilidade, com participação isolada pequena, mas que interagem entre si e também com fatores ambientais (Garcia-Closas e Chanock, 2008).

O genoma humano consiste em aproximadamente de 100 a 150 mil genes. Mutações patogênicas associadas a doenças mendelianas conhecidas foram identificadas em aproximadamente 1000 genes e cerca de 2 a 3 milhões de polimorfismos modificadores de fenótipo já foram descritos (Wild, 2008).

Mutações gênicas podem ser de três tipos: *substituições* – envolvem a troca de um único nucleotídeo; *deleções* – um ou mais nucleotídeos são eliminados; *inserções* – um ou mais nucleotídeos são adicionados (Kwok e Gu, 1999).

O genoma dos indivíduos é idêntico em 99%, com apenas 1% do genoma apresentando polimorfismos (variações). Quando uma variante genética alcança frequência superior a 1% em uma população, passamos a denominá-las de *polimorfismos* (Schor et al., 2004).

Existem diversos tipos de polimorfismos. Dois tipos, que são bastante comuns, serão analisados: os SNPs (*single nucleotide polymorphism*) e os STRs (*short tanden repeats* – ou microssatélites).

Os SNPs são a classe mais frequente de polimorfismos, que surgem a partir de mudanças em nucleotídeos únicos em uma determinada sequência de DNA (Garcia-Closas e Chanock, 2008). Os SNPs estão distribuídos uniformemente por todo o genoma, característica que os tornam excelentes marcadores e que geram mapas genéticos densos (Nussbaum et al., 2007).

Os STRs (*short tandem repeats)* - ou microssatélites, apresentam repetições com unidade básica de 2-6pb e o polimorfismo está baseado no número de repetições. O número de repetições em um *loci* varia de maneira polimórfica entre os indivíduos e, devido ao fato de essas sequências estarem inseridas de forma estável, pode servir como marcadores polimórficos no rastreamento de linhagens paternas, sendo n o número de repetições presentes, que varia de 10 a 60 (Schuit et al., 2004).

Publicações envolvendo polimorfismos têm aumentado nesses últimos vinte anos. O interesse no estudo de polimorfismos reside no fato de que as variações nas sequências genômicas estão por trás da suscetibilidade para desenvolver, ou a capacidade de evitar doenças como o CM.

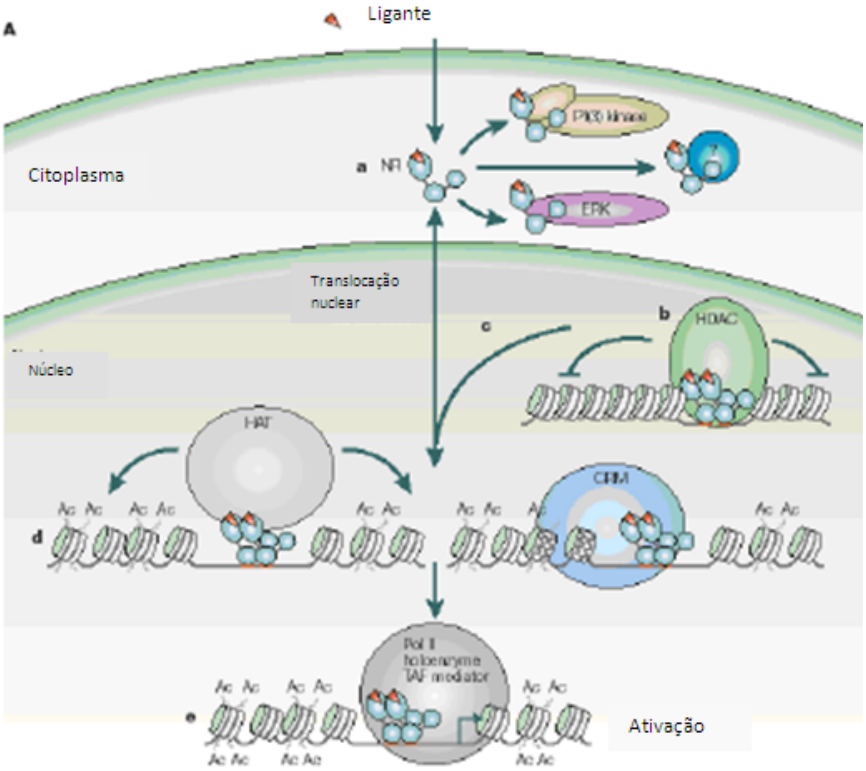
Polimorfismos em diversos genes de baixa penetrância têm sido associados à maior ou menor suscetibilidade ao CM e eles tornam-se particularmente importantes quando são muito prevalentes em determinada população (Garcia-Closas e Chanock, 2008). Esses genes são divididos em três grandes grupos: os que codificam enzimas importantes no metabolismo de hormônios esteróides (COMT, CYP17, CYP19, CYP2D6, RE e RP), os relacionados à expressão de enzimas que participam no processo de carcinogênese (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT1 e NAT2), e os genes com alelos comuns, que têm sido identificados através de estudos com famílias (P53, BRCA1/2) (Dunning et al., 1999).

Entre os genes de suscetibilidade para o CM estão os genes dos receptores estrogênicos (RE). Polimorfismos nesse gene têm sido relacionados com o risco para o CM desde muito cedo (Zuppan et al., 1991).

## 2.7 Polimorfismos do gene do receptor estrogênico e densidade mamográfica

Os esteroides sexuais, principais reguladores da cinética do lóbulo mamário, são lipossolúveis, penetram passivamente no citoplasma e interagem com seus receptores. Estrogênios influenciam no crescimento, diferenciação e funcionamento de muitos tecidos-alvos, incluindo mama, útero e ovários (Jensen e Jordan, 2003).

Efeitos biológicos dos estrogênios são mediados através da afinidade de ligação com seu receptor. Os RE são membros da superfamília de receptores nucleares que controlam a transcrição gênica. As duas principais isoformas do RE são as α e β e apresentam distribuição e padrões de expressão genética distintos em diferentes tecidos (Figura 7).



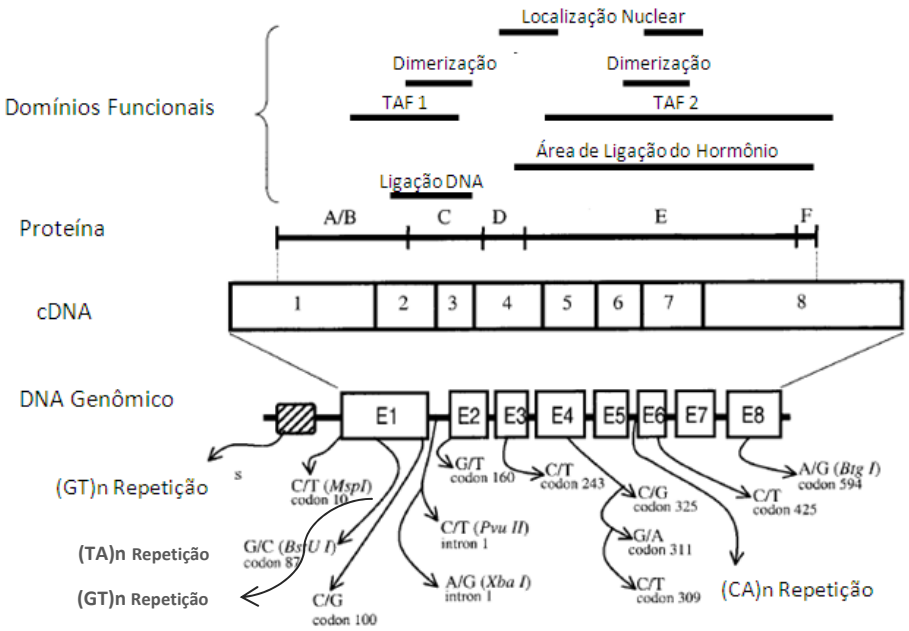

FONTE: Gronemeyer et al., 2004.

**Figura 7. Receptores nucleares em ação. Modo de ação dos receptores nucleares (RN): após difundir-se pela membrana citoplasmática, o ligante pode interagir com receptores cognatos e exercer um efeito não genômico por interagir diretamente, como por exemplo, com quinases (a). A razão de localização entre citoplasma e núcleo pode variar entre diferentes receptores e é afetada pela natureza do ligante. A ligação do ligante no receptor modula uma grande quantidade de fatores. Na ausência do ligante, vários RN são levados a se ligar com regiões regulatórias de genes-alvos com um complexo co-repressor ou com histonas desacetilases (HDAC) (b). Histona desacetilase é responsável pela condensação da cromatina que causa o efeito silenciador do gene. A ligação do ligante dissocia o complexo HDAC (c) e resulta no recrutamento de histonas acetiltransferase (HAT) e de complexos de remodelação de cromatina (CRM) (d). A ordem temporal e o requerimento desses complexos podem ocorrer em um receptor, um gene-alvo ou em uma célula-específica. No último degrau (e), a holoenzima poliferase II, que inclui a enzima pol II, TAF (TATA fator de ligação associada à proteína), e complexos mediadores. Esse recrutamento aumenta a frequência da inicialização da transcrição. Abreviaturas: AD-domínio de ativação; AF1-função de ativação 1; NLS-sinal de localização nuclear**

Tanto a proteína do REα quanto a do REβ agem como fatores de transcrição, induzindo e ligando, contendo um domínio de ligação com o DNA, um domínio de dimerização, um domínio de ligação ao hormônio e diversos domínios de ativação da transcrição (Osborne e Schiff, 2005).

A expressão do REα tem sido amplamente estudada em tumores de mama por ser importante mediador da resposta humoral e por estar envolvido em inúmeras ações dos estrogênios em células alvo, ao induzir, de modo direto, genes associados com o controle da proliferação e apoptose celular, como ciclina D1, TGFα, IGF1 e como receptores de progesterona (Harvey et al., 1999). O gene do REα localiza-se no cromossomo 6 (6q25.1), compõe-se de 8 *éxon*s e abrange mais de 140 kb (Greene et al., 1986).

Para o presente estudo foram escolhidos os polimorfismos no gene do REα: SNPs REα-351 *Xbal* A/G e REα-397 *Pvull* C/T, e o STRs REα(*GT*)n por estarem, em vários estudos, associados a aumento da DM e aumento do risco para o CM (Boyapati et al., 2005; Shin et al., 2003) (Figura 8).




FONTE: Modificado de Gennari et al., 2004.

**Figura 8. Estrutura dos domínios funcionais e descrição dos polimorfismos do gene receptor de estrogênio humano. *Éxon*s (E) são indicados com caixas. TAF, (Fator de Ativação Transcricional)**

## 2.8 Polimorfismo SNPs *Pvull e Xbal*

Mapas genéticos têm revelado a existência de vários sítios polimórficos no gene do REα, sendo os mais estudados o *Pvull* (REα-T397C) e o *Xbal* (REα-A351G). Estes polimorfismos são analisados pela técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) e sequenciamento. O RFLP *Pvull* detecta a substituição de citocina por timina (C/T) na posição -397 antes do *éxon* 2 que é referido como T-397int1C, enquanto o RFLP *Xbal* detecta a substituição de guanina por adenina (G/A) na posição -351 antes do éxon 2 que é referido como A-351int1G (Hall e MacDonnell, 1999). Na literatura, o alelo **C** do REα-397 *Pvull* é denominado de **P** e o alelo **G** do REα-351 *Xbal* de **X**, ambos em abstenção de sítios de restrição. O alelo **T** de ERα-397 *Pvull* é denominado de **p** e o alelo **A** de REα-351 *Xbal* de **x**, ambos apresentando sítios de restrição (Genari et al., 2004) (Tabela 3).

**Tabela 3. Genes de suscetibilidade ao CM e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem CM**

| Gene | Localização Cromossômica | Denominação do gene | Polimorfismo Alelos | Freq. Alélica Média (mín-max) | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| ER | 6q25.1 | Receptor de estrogênio | ERα-351 *Xbal* G/A | | |
| | | | Alelo A | a)0.70; b) 0.56; c) 0.77; d) 0.59 | a)Shin *et al.* 2003; b)Van Duijinhoven et al. 2006; c)jakimiuk et al. 2007; d)Molvarec et al. 2007 |
| | | | Alelo G | a)0.30; b) 0.44; c) 0.33; d) 0.42 | |
| | | | ERα-397 *Pvull* C/T | | |
| | | | Alelo T | a)0.56; b) 0.61; c) 0.51; d) 0.64 | a)Shin et al. 2003; b)Shen et al. 2006; c)Molvarec et al. 2007; d)Hu et al. 2007 |
| | | | Alelo C | a)0.44; b) 0.39; c) 0.49; d) 0.36 | |

Há duas cópias em cada genoma, portanto existem três possibilidades de combinação entre os alelos: dois de baixo risco; um de baixo risco e outro, de alto risco; e, dois, de alto risco. O risco conferido para cada um destes alelos parece ser alelo **dose-locos dependente** (Easton et al., 2007). Em diferentes estudos, estes polimorfismos têm sido associados com várias condições patológicas, tais como: CM, câncer de próstata, osteoporose, endometriose e doenças cardiovasculares (Massart et al., 2001; Brandi et al., 1999; Tanaka et al., 2003). No entanto, os resultados ainda são conflitantes e o mecanismo molecular pelos quais esses polimorfismos influenciam a atividade dos receptores não são claros (Genari et al., 2004). *Pvull* e *Xbal* estão localizados no intron 1, área do gene aparentemente não funcional. Há forte ligação de desequilíbrio entre esses dois polimorfismos, pois são separados por apenas 50 pares de bases. Allelos *P* e *X* (ausência de sítios de restrição), tanto quanto alelos *p* e *x* (presença de sítios de restrição) são fortemente associados um com o outro, apesar de haplótipos *pX* não ter sido observado na maioria dos estudos. O haplótipo *Px* foi detectado, embora em baixa frequência, o que indica que o desequilíbrio não é completo.

A partir do estudo de Zuppan et al., 1991, que relacionou polimorfismos do gene do RE e CM de ocorrência após os 50 anos de idade em 11 famílias com vários casos de CM, houve interesse por novas pesquisas. Assim, Andersen et al.,1994, sabendo que polimorfismos em genes do RE poderiam representar biomarcadores para suscetibilidade ao CM, pesquisaram a associação entre eles e encontraram, na população com CM, a presença do genótipo *Xbal* que foi associada com doença tardia (P= 0,033). Cai et al., 2003[A], também contribuíram para os esclarecimentos acerca dos polimorfismos. Resultados desse estudo, que examinou a associação entre *Pvull* e *Xbal* e o risco de CM, contaram com a participação de 1459 mulheres com o agravo e 1556 controles. Após análises comparativas, verificaram que o polimorfismo *Pvull*-TT e *Xbal*-AA estava associado ao câncer, com OR de 1.4 e 1.3, respectivamente. Da mesma forma, Shin et al., 2003, mostraram associação positiva entre o alelo A do REα-351 com maior risco de CM em publicação, no qual OR para mulheres com o genótipo AA foi de 2.38 comparado àquelas com genótipo GG do

REα-351, havendo efeito protetor em portadoras de pelo menos uma cópia do alelo G (OR= 0.4). Nesse mesmo estudo, quando os dados foram estratificados por fatores de risco conhecidos, nuliparidade ou primeira gravidez acima dos 30 anos de idade, o genótipo AA aumentou 4 vezes o risco (OR: 4,0) comparado com mulheres contendo o alelo G e a primeira gravidez antes dos 29 anos de idade. Wedrén et al., 2004, avaliaram polimorfismo do REα no intron 1 (*Pvull* e *Xbal*) e no *éxon* 4 (C975→G) e CM, e obtiveram resultados positivo somente na união desses polimorfismos em mulheres obesas com câncer ductal. Haplótipos *Xbal* e C975→G (OR=1,48), apresentaram coincidência com o resultado correspondente ao haplótipo *Pvull* e C975→G (OR=1,59).

Estudando a influência do REα e terapia hormonal (TH), na DM (fator de risco independente para CM), van Duijnhoven et al., 2006, relataram a associação entre o aumento da DM e a presença do genótipo REα-397 (OR: 2.24), em mulheres usuárias de TH. Nesse mesmo sentido, Ramos et al., 2009, investigando a distribuição genotípica do polimorfismo *Xbal* em mulheres com mamas densas, verificaram que mulheres com dois alelos mutados (homozigoto mutado) apresentavam 2.5 vezes mais chances de terem mamas densas, quando comparadas àquelas com um ou dois alelos normais para esse polimorfismo (OR = 2.34). Crandall et al., 2009, também associaram DM positivamente a polimorfismos no gene REα. González-Mancha et al, 2008, analisaram a presença da variante *Pvull* em 444 mulheres com câncer de mama e 704 controles, encontrando na genotipagem significante representação do alelo T entre os casos com antecedentes familiares de câncer, em comparação com os controles. Desta maneira a atribuição do polimorfismo *Pvull* foi estatisticamente significante entre casos de câncer familiar (OR=3.81). Por outro lado, Dunning et al., 2009, em revisão sistemática de estudos caso/ controle notaram que não houve associação significativa entre SNPs *Xbal* e *Pvull* e CM ( p=0.06 e p=0.36 respectivamente), porém ressaltaram que a relação entre os SNPs de tais genes e risco de CM poderia ser diferente entre mulheres estratificadas com base em seus níveis estrogênicos e idade, o que não foi considerado pelos autores.

Shen et al. 2006, demonstraram que pode existir combinação funcional dos alelos. Com o objetivo de avaliar se a suscetibilidade dos genótipos REα *Xbal*, REα *Pvull*, CYP1A1 Mspl tinham efeitos somatórios para o risco de câncer de mama, os autores estudaram conjuntamente esses três haplótipos. Seus resultados mostraram que a combinação das variantes alélicas dos três lócus aumentou o risco de CM ainda mais (OR=8.07). Ladd et al. 2007, analisaram 3893 mulheres após a menopausa, registrando aumento não significativo de CM apenas para *Pvull* (OR=1.2), e justificaram este resultado pelo pequeno número de casos (190), o que conferiu poder baixo à pesquisa. Os autores avaliaram seus dados com aqueles da literatura, através de meta-análise, e não encontraram diferenças estatísticas entre os genótipos mutados e selvagens para ambos polimorfismos.

Dumas e Diorio, 2010, também não encontraram diferenças significativas entre mulheres na pré menopausa com polimorfismos do REα (*Pvull* e *Xbal*) e DM (P> 0.05). Porém, em revisão sistemática, as mesmas autoras no ano de 2011, avaliaram estas variantes alélicas e DM, e observaram que, quando as mulheres eram estratificadas para alto nível de estrogênio, apresentavam associação positiva. Esta observação pode, de fato, apontar que exista diferença de fatores que influenciam a DM em mulheres na pré e após a menopausa. Javed et al., em estudo caso controle em 2011, combinaram os efeitos da idade da menopausa, polimorfismos *Xbal* e *Pvull* e a ocorrência de câncer de mama na população paquistanesa e concluíram que o genótipo *Xbal* foi 45% maior nos casos de CM.

Genes de suscetibilidade ao CM e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres com e sem CM estão enumeradas nas tabelas 4 e 5.

**Tabela 4. Estudos de associação do polimorfismo do gene do REα-397 Pvull C/T com câncer de mama e/ou com fatores de risco para a doença**

| Genótipo | Alelo | População | Tipo e tamanho do estudo | Associação | OR / RR | Referências |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REα-*Pvull* 397 T/C | TT | Americana pré e pós menopausa | Somente Casos /Caso controle 257/140 | Diagnóstico em mulheres mais jovens | | Yaich *et a*l. 1992 |
| | TT | Shangai, chinesa | Caso/controle 1069/1166 | ↑ risco para câncer de mama | OR: 1.4<br>IC 95%: 1.1-1.8<br>p= 0,042 | Cai *et al.* 2003[A] |
| | TT | Holandesa, caucasiana | Caso/controle<br>380/422 | ↑ risco para câncer de mama | RR: 1.5<br>IC 95%: 0.94-2.42 | Onland-Moret *et al.* 2005 |
| | TT | Chinesa<br>25 a 55 anos | Caso/controle<br>259/278 | ↑risco de câncer de mama em mulheres com história familiar positiva | OR: 3.04<br>IC 95%: 0.73-12.67 | Shen *et al.* 2006 |
| | TT | Espanhola<br>26 a 86 anos | Caso/controle<br>444/704 | ↑ de risco de câncer de mama em mulheres com história familiar positiva | OR: 3.81<br>IC 95%: 1.25- 11.6 | Gonzalez-Mancha et al. 2008 |
| | TT | Holandesa<br>55 anos ou mais | Caso/controle<br>190/3513 | ↑ de risco de câncer de mama em mulheres após a menopausa | OR: 1.4<br>IC 95%: 0.8-2.2 | Ladd et al.2007 |
| | TT | Americanas, peri menopausa<br>42 a 52 anos | Cohort longitudinal<br>451 | ↑Maior densidade mamográfica em mulheres brancas | 7,0%;<br>p=0,01 | Crandall et AL 2009 |
| | TT/ TC | Holandesa e inglesa, após menopausa | Populacional Cohort prospectivo Caso/controle (795 com TH/781 sem TH) | ↑ Maior densidade mamográfica somente em usuárias de TRH | 2.24%<br>p<0.01 | van Duijnhoven *et al.* 2006 |
| | TC | Holandesa | Caso/controle380/422 | ↑ risco para câncer de mama | OR: 1.14<br>IC 95%: 1.00-1.32 | Onland-Moret *et al.* 2005 |
| | TC | Chinesa<br>25- 55 anos | Caso/controle<br>259/278 | ↑ risco para câncer de mama ( com história familiar) | OR: 2.46<br>IC 95%: 0.61-9.88 | Shen *et al.* 2006 |
| | CC | Shangai, chinesa<br>22-64 anos | Populacional Cohort prospectivo<br>1459 casos | Expressão RE negativa; pior prognóstico para câncer de mama | OR: 3.30<br>IC 95%: 1.42-7.69 | Boyapatti *et al.* 2005 |
| | CC | Holandesa e inglesa, após menopausa | Populacional Cohort prospectivo caso/controle (795/781) | Densidade mamográfica sem alterações em usuária de TH | 0.90%<br>p= 0.47 | van Duijnhoven *et al.* 2006 |

**Tabela 5. Estudos de associação do polimorfismo do gene do REα-351 Xbal A/G com câncer de mama e/ou com fatores de risco a doença**

| Genótipo | Alelo | População | Tipo e tamanho do estudo | Associação | OR / RR | Referências |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **REα351 *Xbal* A/G** | AA | Norueguesa 27 a 94 anos | Caso/controle 360/672 | ↑ risco para câncer de mama após menopausa | OR: 2.02 IC 95%: 0.96-4.31 | Andersen *et al.* 1994 |
| | AA | Koreana | Caso/controle 205/205 | ↑ risco para câncer de mama | OR: 2.38 IC 95%: 1.58-3.58 | Shin *et al.* 2003 |
| | AA | Koreana | Caso/controle 205/205 | ↑ risco para câncer de mama em nulíparas | RR: 4.0 IC 95%: 1.9-8.8 | Shin *et al.* 2003 |
| | AA | Holandesa e inglesa, após menpausa | Cohort, prospectivo 791 com TH/ 781 sem TH | ↑ densidade mamagráfica em usuárias de TH | 2,20% p<0,01 | van Duijnhoven *et al.* 2006 |
| | AA | Chinesa | | ↑ risco para câncer de mama | OR: 6.88 IC 95%: 0.80-59.15 p=0.079 | Hu *et al.* 2007 |
| | AA | Chinesa 25-55 anos | Caso/controle | ↑ risco para câncer de mama; com história familiar positiva | OR: 4.20 IC 95%: 0.65-27.28 | Shen et al. 2006 |
| | AA | Holandesa, 55 anos ou mais | Caso/controle 190/3513 | ↑ risco para câncer de mama em mulheres após menopausa | OR: 1.3 IC 95%: 0.7-2.2 | Ladd et al. 2007 |
| | AA | Brasileira após menopausa | Prospectivo 120 | ↑ maior densidade mamária | OR: 2.34 IC95%:1.06-5.16 p=0.03 | Ramos et al. 2009 |
| | | Canadense pré menopausa Idade média =48 anos | Populacional observacional 741 | Não significante associação com a densidade mamográfica | p>0.05 | Dumas and Diorio. 2010 |
| | | Inglesa | Revisão sistemática de estudos caso controle | Diferença não significativa | P=0,06 | Dunning et al. 2009 |
| | **AA** | Paquistanesas, 15-65 anos | Caso/controle 100/100 | ↑ de risco de câncer de mama após a menopausa | AA 45% maior que GG p<0,01 | Javed et al. 2011 |
| **Haplotipo CC *Xbal*-C975→G** | | Suecas, após a menopausa | Caso/controle 1556/1512 | ↑ de risco de Câncer de mama em mulheres após a menopausa e obesas | OR=1,48 IC 95%: 1,17-1,88 | Wedren et al. 2004 |
| | AG | Norueguesa 27 – 94 anos | Caso/controle 360/672 | ↑ risco para câncer de mama | OR: 2.00 IC 95%: 0.92-4.37 | Andersen *et al.* 1994 |
| | GG | Americana, caucasiana maior que 65 anos | Caso/controle 393/790 | ↓ risco para câncer de mama | OR 0.82 IC 95%: 0.68-1.00 P= 0.04 | Wang *et al.* 2007 |
| | GG | Holandesa e inglesa, após menopausa | Cohort prospectivo 795 comTH 781 sem TH | Densidade mamográfica sem alterações em usuária de TRH | 0,65% p= 0.70 | van Duijnhoven *et al.* 2006 |
| | A | Chinesa | Caso/controle 114/121 | ↑risco para câncer de mama | OR: 1.4 IC 95%: 1.0-1.9 | Hu *et al.* 2007 |
| | G | Koreana | Caso/controle 205/205 | ↓ risco para câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas | RR: 0.3 IC 95%: 0.1-0.5 | Shin *et al.* 2003 |

## 2.9 Microssatélite (*GT)n*

Curvaturas de DNA têm sido detectadas em muitos genes de eucariontes (Schatz e Langowski, 1997; Miyano et al., 2001), e tem sido sugerido que essas regiões organizem a infraestrutura da cromatina, local apropriado para a transcrição. Essas curvaturas foram denominadas de regiões promotoras do gene, descritas primeiramente por Keaveney et al., em 1991. O objetivo e função das regiões promotoras do gene do REα são questionados desde a sua descoberta. Provavelmente uma das mais óbvias implicações é o potencial para funcionarem como reguladores tecido específicos, para regularem, portanto, a expressão do RNAm em diferentes tecidos de forma diferente (Kos et al., 2001).

A região promotora C, localizada anterior ao gene do REα, no *Éxon* 1, expressa-se diferentemente no tecido mamário normal e com carcinoma (Weigel et al., 1995). Recentemente, o polimorfismo de repetição dinucleotídeo (*GT*)n foi notado nessa região, sendo este o segundo polimorfismo de repetição detectado no gene do REα, seguindo a identificação da variável de repetição (TA)n, localizada no intron 5 (Del Senno et al., 1992). Estes apresentam repetições com unidade básica de 2pb e o polimorfismo basea-se no número de repetições. O microssatélite *GT* está a 6627bp anterior à região de início do sítio de transcrição do *éxon* 1 e a 144 kb antes do primeiro não traduzido *éxon* E2 (Sand et al., 2002). Estes polimorfismos podem ter impacto sobre a expressão gênica por influenciar a transcrição e/ou estabilidade do RNAm (Ding et al., 2010).

Dezesseis alelos de repetição foram observados, variando de $(GT)_{11}$ a $(GT)_{27}$. Entre eles, o alelo $(GT)_{16}$ está presente em 41.5% dos casos de CM e 37% dos controles (Cai et al. 2003)[B]. Com relação a esse tipo de STRs, os cinco alelos mais comuns foram: (*GT*)15, (*GT*)16, (*GT*)17, (*GT*)18 e (*GT*)23; e dentre esses alelos, o (*GT*)23 aumentou o risco de morte (Boyapati et al., 2005). Porém, esses resultados não são unânimes, pois outros estudos mostraram que pacientes com esse genótipo foram associadas à diminuição de risco e à redução da expressão de receptor de progesterona (Curran et al., 2001).

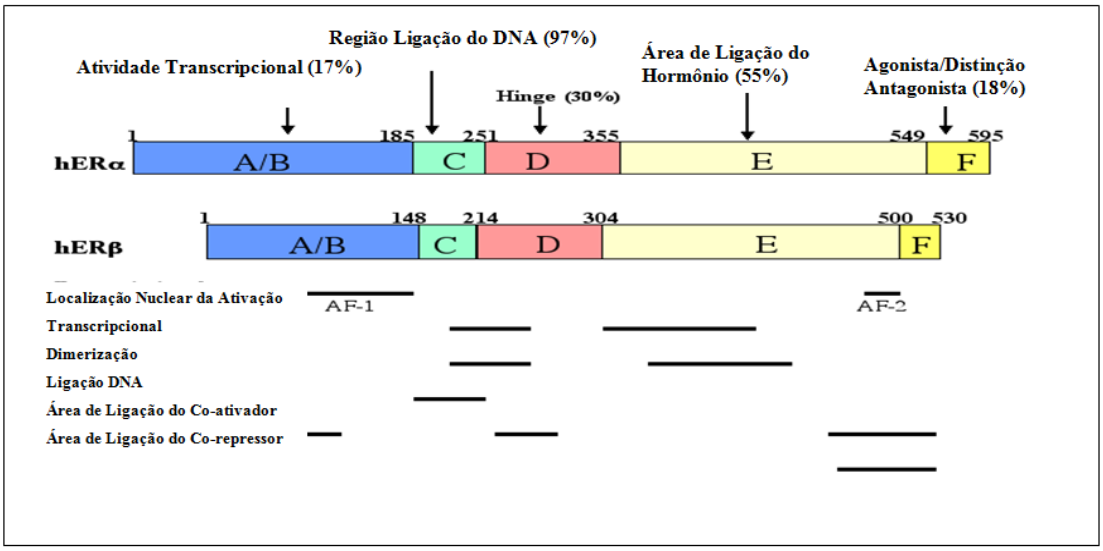
Cai et al., em 2003[B], estudaram 1459 mulheres com CM, compararam os resultados com 1556 controles e encontraram forte associação entre o polimorfismo (*GT*)16 a 17 com o câncer de mama (Tabela 6).

**Tabela 6. Frequência do alelo polimórfico (GT)n do REα em casos de câncer de mama e em controles sadios**

| Alelo | (*GT*)n repetições | Casos | | Controles | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | No. de alelos | % | No. de alelos | % | *Pa* |
| (*GT*)11 | 11 | 1 | 0.05 | 0 | 0 | 0.488 |
| (*GT*)13 | 13 | 3 | 0.16 | 4 | 0.20 | 4.000 |
| (*GT*)14 | 14 | 1 | 0.05 | 1 | 0.05 | 1.000 |
| (*GT*)15 | 15 | 230 | 12.14 | 229 | 11.53 | 0.585 |
| (*GT*)16 | 16 | 786 | 41.50 | 748 | 37.66 | 0.015 |
| (*GT*)17 | 17 | 106 | 5.60 | 147 | 7.40 | 0.023 |
| (*GT*)18 | 18 | 259 | 13.67 | 313 | 15.76 | 0.070 |
| (*GT*)19 | 19 | 31 | 1.64 | 26 | 1.31 | 0.425 |
| (*GT*)20 | 20 | 12 | 0.63 | 11 | 0.55 | 0.836 |
| (*GT*)21 | 21 | 87 | 4.59 | 99 | 4.98 | 0.599 |
| (*GT*)22 | 22 | 82 | 4.33 | 82 | 4.13 | 0.811 |
| (*GT*)23 | 23 | 204 | 10.77 | 237 | 11.93 | 0.266 |
| (*GT*)24 | 24 | 38 | 2.01 | 40 | 2.01 | 1.000 |
| (*GT*)25 | 25 | 45 | 2.38 | 44 | 2.22 | 0.749 |
| (*GT*)26 | 26 | 3 | 0.16 | 4 | 0.20 | 1.000 |
| (*GT*)27 | 27 | 6 | 0.32 | 1 | 0.05 | 0.064 |
| N° total de alelos | | 1894 | | 1986 | 100.00 | |
| $X^2 = 19.16$, df = 15, p = 0.207 | | | | | | |

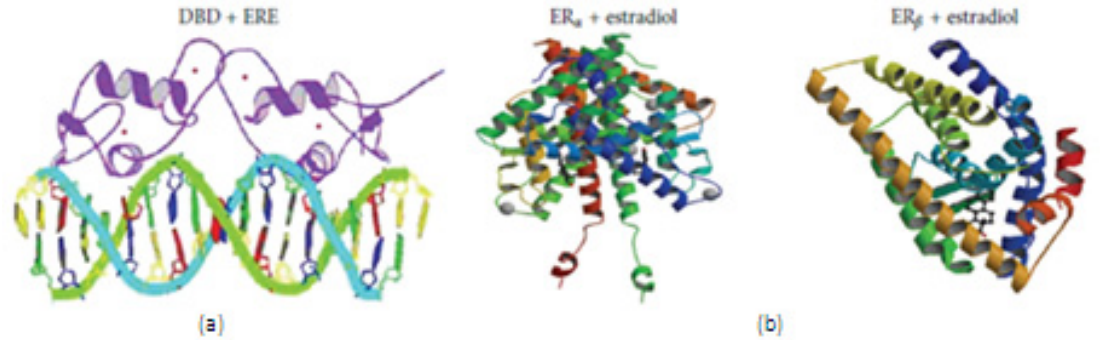
## 2.10 Receptor estrogênico

O RE é uma proteína nuclear, que apresenta dois tipos: α e β, compostos por 595 e 485 aminoácidos, respectivamente (Figuras 9 e 10). Os receptores apresentam seis regiões funcionais dominantes, com funções específicas (A-F) transcritas por oito *éxon*s (Schor et al., 2004).




FONTE: Klinge, 2000.

**Figura 9. Estrutura do receptor**




FONTE: Kumar et al., 2011

**Figura 10. (a)mostra receptor estrogênico ligado ao DNA (complexo com DNA - RE). (b) mostra a estrutura dimensional do REα (à esquerda) e REβ (à direita) ligado ao estradiol**

Para o REα, a região A/B é formada pelos aminoácidos de 1 a 180, relaciona-se com NH2 terminal e modula a transcrição, sendo a parte mais imunoativa do receptor.

A região C, composta pelos aminoácidos 180-262, contém duas pontes de zinco que medeiam a ligação do receptor aos hormônios. Esta região se liga ao DNA e apresenta duas sub-regiões CI e CII, compostas pelos aminoácidos de 180 a 215 e 216 a 262, respectivamente; são responsáveis pela seletividade e especificidade.

A região D, sendo constituída por aminoácidos de 263 a 302, está envolvida com a interação da proteína hsp90 e com a localização nuclear do receptor.

A região E é composta de aminoácidos de 302 a 552, sendo responsável pela eficiência da ligação do receptor ao hormônio, pela dimerização do receptor, pela interação com a proteína hsp90 e pela ativação da transcrição.

A região F apresenta COOH terminal e tem ação moduladora específica.

O RE encontra-se em sua forma inativa no citosol, ligado à complexo inibidor, as proteínas de choque hsp90 e hsp70. A fixação do ligante (hormônio) com o receptor no domínio carboxiterminal faz com que a proteína hsp90 se dissocie, ativando o receptor pela exposição do seu sítio de ligação ao DNA. O RE ativado migra para dentro do núcleo, onde pode agir direta ou indiretamente provocando ações genômicas (Greene, 1986).

# 3 OBJETIVOS

Verificar em mulheres com mamas densas após a menopausa:

1) A distribuição dos fatores de risco para o câncer de mama;

2) As frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene do REα-351 Xbal G/A, REα-397 Pvull T/C e a distribuição dos haplótipos;

3) A genotípagem dos microssatélites (GT)n da região promotora do gene do REα;

4) A associação entre os resultados moleculares e os fatores de risco para o câncer de mama.

# 4 MÉTODOS

Foram incluídas prospectivamente 308 mulheres na pós menopausa, selecionadas no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de janeiro de 2010 a março de 2011. Inicialmente, selecionou-se 3500 mamografias de mulheres com idade de 45 a 65 anos. Através da história clínica colhida nesse Instituto, para realização do exame, apenas 1200 preenchiam os critérios de inclusão e exclusão. As mamografias dessas 1200 mulheres foram, então, avaliadas por um único examinador de forma subjetiva e resultou em 384 mamas densas. Convocaram–se todas as mulheres com mamas densas por telefone para que comparecessem no ambulatório de Ginecologia Endócrina e Climatério desse Hospital para nova entrevista, exame físico, coleta de sangue periférico e assinatura de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). Destas, somente 317 compareceram, sendo todas as 317 mamografias avaliadas de forma objetiva e 308 mamas densas foram identificadas por esse método. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq (nº 0297/09), em anexo B.

## 4.1 Critérios de inclusão

Amenorreia por tempo ≥ 1 ano.

Idade entre 45 a 65 anos.

Mamas densas na mamografia (BI-RADS®).

## 4.2 Critérios de exclusão

Mulheres com câncer de mama ou ovário atual ou anterior.

Resultado na mamografia BI-RADS® 4 ou 5.

Uso de terapia hormonal nos últimos 12 meses.

## 4.3 Entrevista e exame físico

Na entrevista e exame físico foram avaliados os seguintes fatores de risco para câncer de mama: idade da menarca e menopausa, paridade, idade ao nascimento do primeiro filho, antecedentes familiares de câncer de mama, hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica e Índice de Massa Corpórea (Anexo C).

O IMC foi calculado pela razão peso(Kg)/altura($m^2$), desenvolvido por Lambert Adolph Jacques Quetelet, matemático belga em 1869.

Após essa caracterização, as pacientes foram subdivididas em dois grupos:

Grupo 1 – mulheres de peso normal (IMC $<25$ kg/$m^2$).

Grupo 2 – mulheres com sobrepeso/obesidade (IMC $\geq 25$ kg/$m^2$).

## 4.4 Exames subsidiários de análise clínica

Glicemia, triglicérides, colesterol total e frações: HDL, LDL, VLDL; insulina; IGF1; TSH; T4; T4 livre; T3; FSH; LH e estradiol.

## 4.5 Classificação das mamografias

A classificação das mamografias foi determinada segundo critérios do ACR BI-RADS®2003 (Tabela 7).

**Tabela 7. Classificação das Mamografias segundo BI-RADS®**

| Categorias BI-Rads® (quarta edição, 2003) | | | |
|---|---|---|---|
| **Categoria** | **Interpretação** | **Risco de câncer** | **Conduta** |
| 0 | Inconclusivo | | Exame adicional (ultrassonografia, magnificação ou compressão localizada) |
| 1 | Benigno | 0,05% | Controle anual a partir dos 40 anos |
| 2 | Benigno | 0,05% | Controle anual a partir dos 40 anos |
| 3 | Provavelmente benigno | Até 2% | Repetir em seis meses (eventualmente biópsia) |
| 4 (A, B, C) | Suspeito | >20% | Biópsia |
| 5 | Provavelmente maligno | >75% | Biópsia |
| 6 | Lesão já biopsiada e diagnosticada como maligna, mas não retirada ou tratada | 100% | |

FONTE: ***Breast Imaging Reporting and Data System*: BI-RADS®.** 4th ed. Copyright 1992, 1993, 1995, 1998, 2003 *American College of Radiology.*

## 4.6 Determinação da densidade mamográfica

Todas as pacientes foram submetidas à mamografia bilateral. Realizou-se triagem das pacientes com mamas densas de forma subjetiva, segundo os padrões BI-RADS® 2003, por um mesmo examinador (Professor Nestor de Barros), anexo D.

Após essa seleção (triagem), as mamografias foram avaliadas de forma objetiva: As imagens foram digitalizadas no Laboratório de Qualificação de Imagens Médicas (QualIM) do Departamento de Imagens Médicas da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP utilizando scanner específico para mamografias da Lumisis, modelo *Lumicam* 75, que gera imagens não comprimidas em formato TIFF de 16 hits/pixel. As imagens foram armazenadas em HD externo e posteriormente visualizadas no programa *Imaging J*.

Com esse programa empregava-se, inicialmente, a ferramenta *magic hand tool*, selecionando toda a mama (com cuidado para excluir o músculo peitoral), encontrando, assim, um valor numérico que correspondia à quantidade *pixels* da área mamária geral (Figura 11).

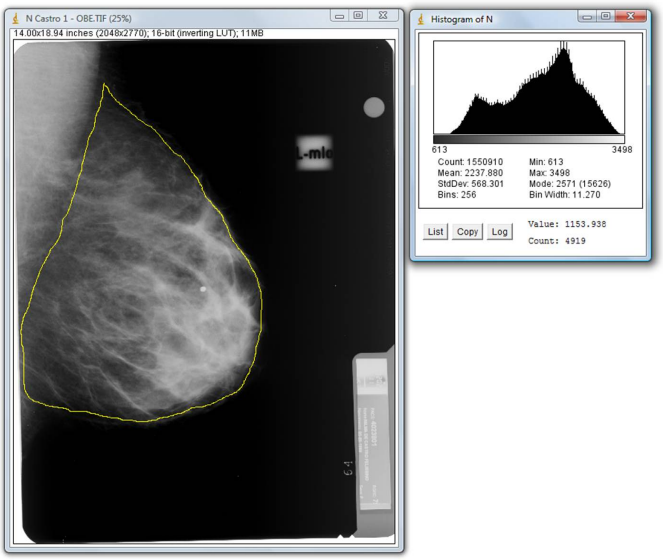



**Figura 11. Seleção da área mamária total pelo programa *Imaging J***

A seguir, selecionava-se com a mesma ferramenta a área mamária mais densa, obtendo-se, dessa forma, a quantidade de *pixels* dessa região (Figura 12).

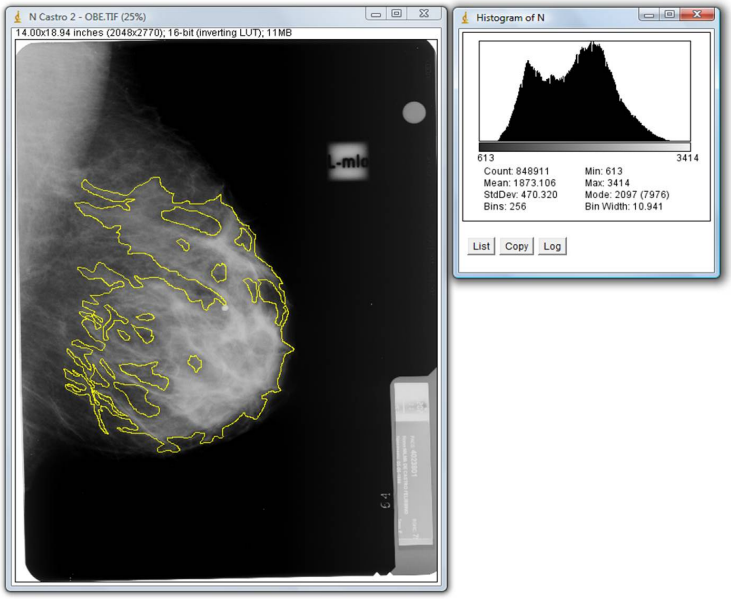



**Figura 12. Seleção da área mamária de predominância fibroglandular, pelo programa *Imaging J***

Finalmente, para determinar um valor percentual de tecido fibroglandular, estabelecia-se a relação entre os dois valores iniciais, conforme a seguinte relação:

**Densidade Mamográfica = Área densa (pixels) x 100 / Área total (pixels)**

Os valores assim obtidos foram comparados com os valores subjetivos, para posterior avaliação do grau de concordância.

Apenas as mamografias com os valores percentuais de mais de 50% de tecido fibroglandular foram consideradas mamas densas, usando como forma de referência as densidades obtidas de forma objetiva, por ser um método exato e desprovido de tendências.

**Padrões de densidade mamográfica segundo o sistema BI-RADS®**

*Padrão 1:* mamas predominantes adiposas, com menos de 25% de tecido fibroglandular ( radiotransparente devido à alta proporção de gordura)

*Padrão 2:* mamas parcialmente lipossubstituídas, com 25 a 50% de tecido fibroglandular.

*Padrão 3:* mamas heterogeneamente densas ( densidade fibroglandular de aspecto nodular ocupando de 50 a 75% do volume mamário).

*Padrão 4:* mamas extremamente densas, com parênquima homogêneo ocupando mais de 75% do volume mamário

## 4.7 Coleta de material biológico

Amostras de sangue periférico foram coletadas em frascos contendo EDTA. A fração contendo os polimorfonucleares foi separada do soro e das hemáceas por centrifugação (3.000 rpm por 20 minutos a 4° C) e conservada a -20°C, para posterior extração de DNA genômico.

### 4.7.1 Extração do DNA de sangue periférico

A extração do DNA realizou-se segundo protocolo do kit **DNA blood** *(Qiagen).* Ao concentrado celular (botão leucocitário) adicionaram-se 20 µl de protease (Qiagen) em tubo de 1,5 ml e 200µl de TAL. Agitou-se em vortex (*Scientific Industries*) até que se obteve uma solução homogênea. Seguiu-se a essa etapa incubação a 56°C por 10 minutos. Centrifugou-se brevemente a amostra e adicionaram-se 200µl de etanol (96- 100%). Centrifugou-se a amostra brevemente. Aplicou-se a amostra na coluna de 2 ml com nova centrifugação a 8000 rpm/ 1 minuto Tranferiu-se a coluna para novo tubo de coleta de 2 ml e adicionaram-se 500µl de TAW1. Centrifugou-se novamente a 8000rpm/1 minuto. Foram colocadas nessa amostra 500µl de TAW2 e centrifugou-se a velocidade máxima por 3 minutos. Transferiu-se a coluna para novo tubo de 2 ml e centrifugou-se a velocidade máxima por 1 minuto. A coluna foi transferida para novo tubo de 1,5 ml e adicionaram-se 200µl de $H_2O$ MilliQ, com nova incubação a T ambiente por 5 minutos para aumentar o rendimento de DNA recuperado. Finalmente centrifugou-se a 8000 rpm/ 1 minuto e armazenou a amostra a -20°C.

### 4.7.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA genômico obtido foi feita através de espectrofotometria em aparelho NanoDrop (Thermoscientific) com comprimento de onda de 280nm.

### 4.7.3 Reação em cadeia de polimerase para o *íntron* 1 do gene do REα

Foram utilizados de 20 - 200ng do DNA genômico (Figura 13), em um volume final de 50 µl de reação contendo 20 mM Tris-HCL (pH 8,4), 50mM KCL, 0,2 mM DNTP, 0,1 mM de cada *primer* ( senso 5'-cgt cta ctc cta tgt ctg gt-3' e anti senso 5'-cgt gta gac tga agg gca t-3'), 1,5 mM de MgCl2 e 0,4 U de Taq platinum DNA Polymerase (Invitrogen). A reação ocorreu em termociclador VERITI (Apllied Biosystems) com a seguinte ciclagem: pré-aquecimento a $95^0$C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95ºC por 15 segundos, 50ºC por 15 segundos e 72ºC por 60 segundos.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% impregnado com brometo de etídio. O tamanho do esperado para o amplicon foi 227pb.

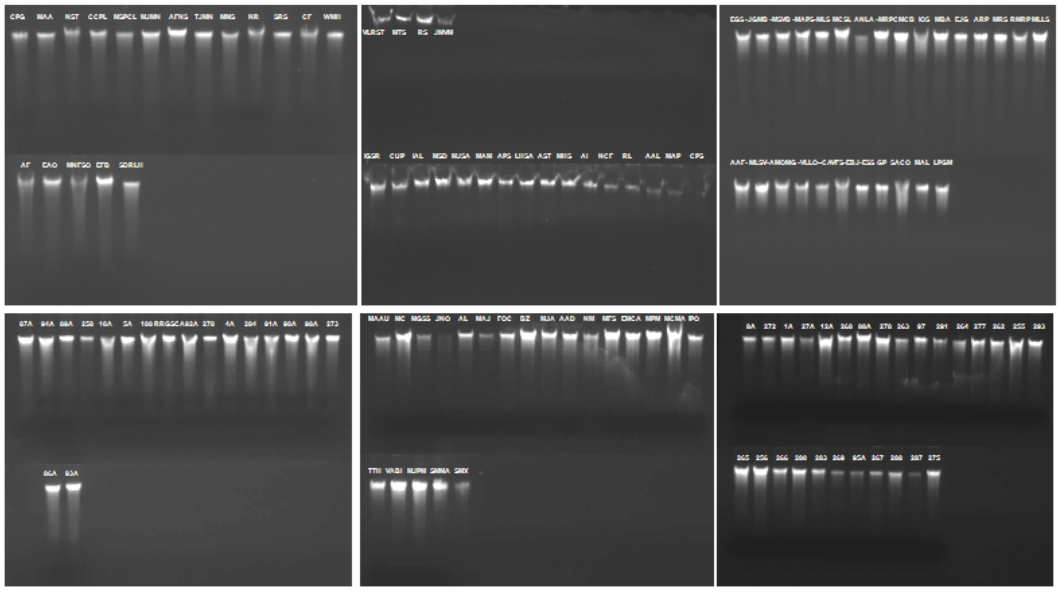


**Figura 13. Gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídio apresentando o perfil do DNA genômico extraído a partir de amostras de sangue das pacientes com mamas densas**

### 4.7.4 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Para análise do polimorfismo presente no *íntron* 1 do gene REα, os produtos de PCR foram incubados em volume final de 20 µl a 37°C por 4 horas , contendo 3UN *Pvull* e 3UN *Xbal* (*Life Technologies , Carlsbad , California, U.S* ), 2µl do "*React 2 Buffer*", 0,2 uL de BSA (albumina sérica bovina) e 17,3µl do produto do PCR (Figura 14), anexo E.

A enzima de retrição *Pvull* reconhece o seguinte trecho da sequência da PCR amplificado para este trecho do gene REα :

5'...CAG↑CTG...3'/3'...GTC↓GAC ...5'.

Já a enzima *Xbal* reconhece o trecho da sequência da PCR amplificado para este trecho do gene REα:

5'...T↑CTAGA...3'/3'...AGATC↓ T...5'.

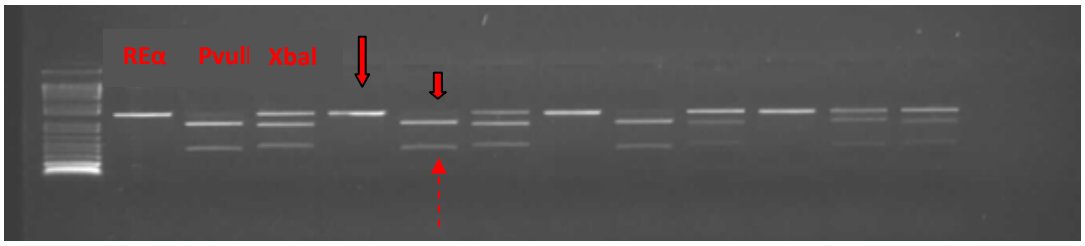



**Figura 14. Gel agarose impregnado com brometo de etídeo apresentando os fragmentos de PCR referentes ao *íntron* 1 do receptor de estrogênio alfa. A seta contínua mostra a migração em 1.3 Kb do fragmento íntegro (S); a seta menor a migração em ~900pb e a seta pontilhada a migração em ~400 pb. O primeiro fragmento mostra REα, o segundo obtido com digestão por *Pvull* e o terceiro o fragmento obtido por digestão com *Xbal*.**

### 4.7.5 Determinação dos microssatélites *(GT)n*

O polimorfismo de repetição (*GT*)*n* foi confirmado por sequenciamento direto, utilizando o sequenciador de DNA automático *ABI PRISM 3700* (Life Technologies).

A figura 15 ilustra o primer da região promotora contendo as repetições de dinucleotídeo *(GT)n* do gene do REα, (Anexo E).

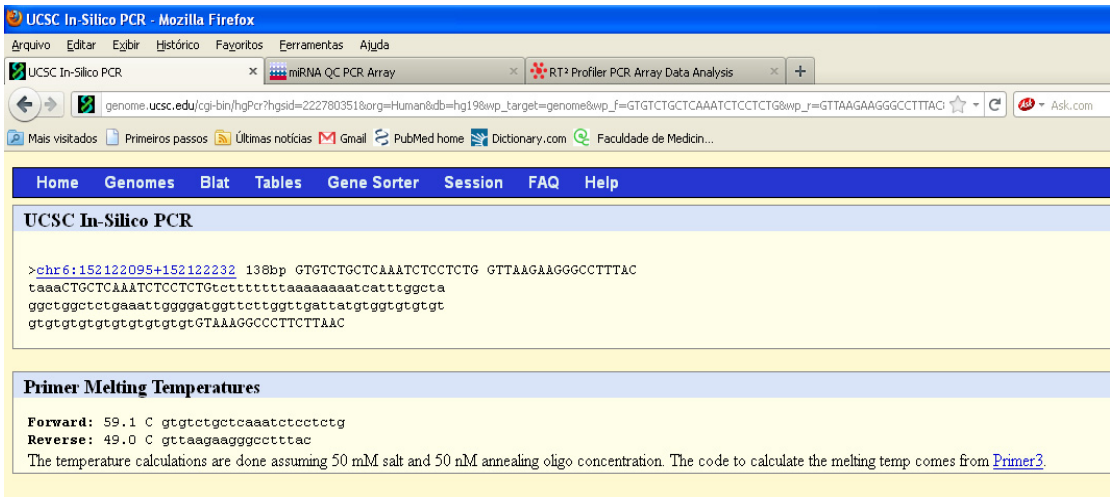



**Figura15. *Primer* da região promotora contendo os *tandem repeats GT* do gene do REα**

#### 4.7.5.1 Reação de sequenciamento

Conforme instruções do fabricante para o sequenciamento em *ABI PRISM 3500 (Life Technologies)*, o mix da reação foi preparado de acordo com a análise quantitativa das bandas encontradas em gel de agarose. Foram realizadas duas reações para cada fragmento analisado, uma para a fita senso e outra para a fita anti-senso, a fim de cobrir toda a área de interesse e confirmar o resultado através da comparação das duas fitas, que devem ser complementares por toda a extensão do fragmento em questão. As amostras utilizadas apresentavam bandas com massa em torno de 100 ηg de DNA. Para o oligonucleotídeo iniciador, a concentração final foi

de 5 ρmol/µl. O pre-mix, contendo os demais reagentes da reação, provém do kit *Big Dye Terminador Chemistry (Life Technologies)*. O volume final, nesse caso 10 µl, foi completado com água ultrapura (livre de RNAses e DNAses). Dentre os dNTPs utilizados, alguns são marcados com um agente fluoróforo e possuem uma hidroxila a menos no carbono 3 da molécula, sendo, portanto, chamados de dideoxinucleotídeos. Isto faz com que a extensão da fita seja interrompida quando estes são incorporados e seja emitida uma fluorescência característica, que vai ser capturada pelo aparelho sequenciador. A reação foi levada ao termociclador e submetida a uma desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto e 35 ciclos de variação de temperatura, permanecendo por 15 segundos a 95°C para a desnaturação das fitas do DNA, 5 segundos a 55°C para o anelamento do oligonucleotídeo iniciador, 4 minutos a 60°C para que a enzima pudesse realizar a extensão das fitas e, por tempo indeterminado, a 4°C, interrompendo a reação.

#### 4.7.5.2 Precipitação e purificação do produto da reação de sequenciamento com "Isopropanol"

Adicionou-se uma solução contendo 60 uL de etanol absoluto e 5 uL de EDTA 125mM em cada poço, vortexou-se por 30 segundos e em seguida a placa ficou incubada em temperatura ambiente, protegida da luz, por 15 minutos. Fez, então, uma centrifugação de 30 minutos a 2180 g em temperatura ambiente. (AC=6 / BRAKE=0); desprezando o sobrenadante por inversão (sem bater a placa). O passo subsequente consistiu em centrifugar a parte superior da placa de baixo sobre a sustentação de um papel por 1 minuto a 190 g; adicionaram-se 60 uL de etanol a 70%, vedando bem a placa e vortexou-se por aproximadamente 1 minuto. Novamente centrifugou-se por 15 minutos a 1650 g em temperatura ambiente. (AC=6 / BRAKE=0); desprezou-se o sobrenadante por inversão (sem bater a placa) e centrifugou-se a parte superior da placa para baixo sobre a sustentação de um papel por 1 minuto a 190 g. O produto foi ressuspendido em 10 uL de formamida HI-DI (presente no kit de sequenciamento), incubado por 4 minutos a 95°C e colocado imediatamente no gelo. Após este processo, as amostras estavam prontas para o sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram feitas em placas de 96 poços, uma vez que a separação dos fragmentos gerados foi feita por eletroforese capilar no aparelho *ABI PRISM 3500 (Life Technologies)*, que capta o sinal fluorescente dos dideoxinucleotídeos e fornece o resultado na forma de picos de fluorescência. Para verificar a qualidade das sequências obtidas após a eletroforese, utilizou-se o software *BioEdit v7.1.3 (*Ibis Biosciences) (Figura 16).

**Figura 16. Gráfico representativo do sequenciamento gênico da região promotora do receptor estrogênico alfa de paciente com mama densa. No painel superior, é possível observar a região de repetição (*GT*)n amplificada pelo iniciador senso. No painel inferior, a região amplificada pelo iniciador antissenso**

### 4.7.6 Controles internos do PCR

Para assegurar a integridade dos reagentes, todas as reações foram processadas contendo um controle interno negativo – com a substituição do volume do DNA por H2O de "*nuclease-free"Promega.*

Já para a presença de DNA suficiente na reação, é necessário fazer um controle interno com a substituição do *primer* específico pelo *primer* do gene da beta-globulina *(sense* – 5'CAA Ctt CAT CCA C*GT* TCA CC-3'- e anti *sense* – 5'-GAA GAG CCA AGG ACA G*GT* AC-3').

### 4.7.7 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

O princípio de *Hardy-Weinberg* (H_W) foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas dos polimorfismos *Pvull* e *Xbal* da nossa população estavam em equilíbrio genético. Este é um modelo matemático simples [$(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$] utilizado para calcular as frequências genotípicas a partir das frequências alélicas. Demonstra que as frequências genotípicas de uma população se mantêm constantes quando não há força evolutiva atuando sobre a mesma. Para que o princípio seja demonstrado, a população em questão deve estar em equilíbrio genético. Portanto, o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* é muito útil para o estudo dos mecanismos evolutivos de uma população (Nussbaum et al., 2007). Na equação $p^2+2pq+q^2=1$, p é a frequência do alelo dominante enquanto q é a frequência do alelo recessivo. Deste que $p+q=1$, portanto $(p+q)^2=1$ resultando na equação de equilíbrio de H-W. Portanto, $p^2$ e $q^2$ são as frequências esperadas para homozigoto dominante e homozigoto recessivo, respectivamente, enquanto 2pq é a frequência esperada para heterozigotos na população. Diz-se que os polimorfismos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* quando $p>0,05$.

### 4.7.8 Distribuição dos Haplótipos

A distribuição dos haplótipos foi feita para verificar se a população em estudo está em desequilíbrio de ligação, o qual foi determinado pelas medidas (*r2* e *D'*), o que permitiu verificar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs *Pvull* e *Xbal.* Haplótipos referem-se à combinação de alelos de diferentes polimorfismos que estão em proximidade no mesmo cromossomo. Podem, portanto, ser transmitidos juntos. Para que haja essa transmissão, o polimorfismo tem que estar em desequilíbrio de ligação, o qual acontece quando o mesmo haplótipo ocorre mais frequentemente que o esperado ao acaso, ou seja, esses marcadores encontram-se ligados, formando blocos (Figura 17). O desequilíbrio entre os SNPs pode ser avaliado por D´. Onde D´ varia de 0 (não desequilíbrio) a 1 (total desequilíbrio) (Pharoah et al., 2004).

Considerando um par de alelos no *locus* 1, *A* e *a*, e no *locus* 2, *B* e *b*, com as respectivas frequências *pA*, *pa*, *pB* e *pb*, as probabilidades de encontrar os alelos destes dois *loci* juntos, no mesmo cromossomo, são: *pAB*, *pAb*, *paB* e *pab*. Se estiverem em equilíbrio de ligação, os alelos do *locus* 2 (*B* e *b*) são independentes dos alelos do *locus* 1 (*A* e *a*), ou seja, *pAB* = *pApB*. Uma medida direta de medir o desequilíbrio de ligação (*D*) é por meio da diferença entre as frequências alélicas *pAB* e *pApB*, ou seja, *ab* ( *AB A B* ) *D* = π −π π.

Uma série de estatísticas tem sido usadas para medir o desequilíbrio de ligação, sendo que todas têm como componente básico a diferença entre as frequências alélicas observada e esperada (*Dab*). As duas estatísticas mais usadas para mensurar o desequilíbrio de ligação são *r2* e *D'* (Flint-Garcia et al., 2003).

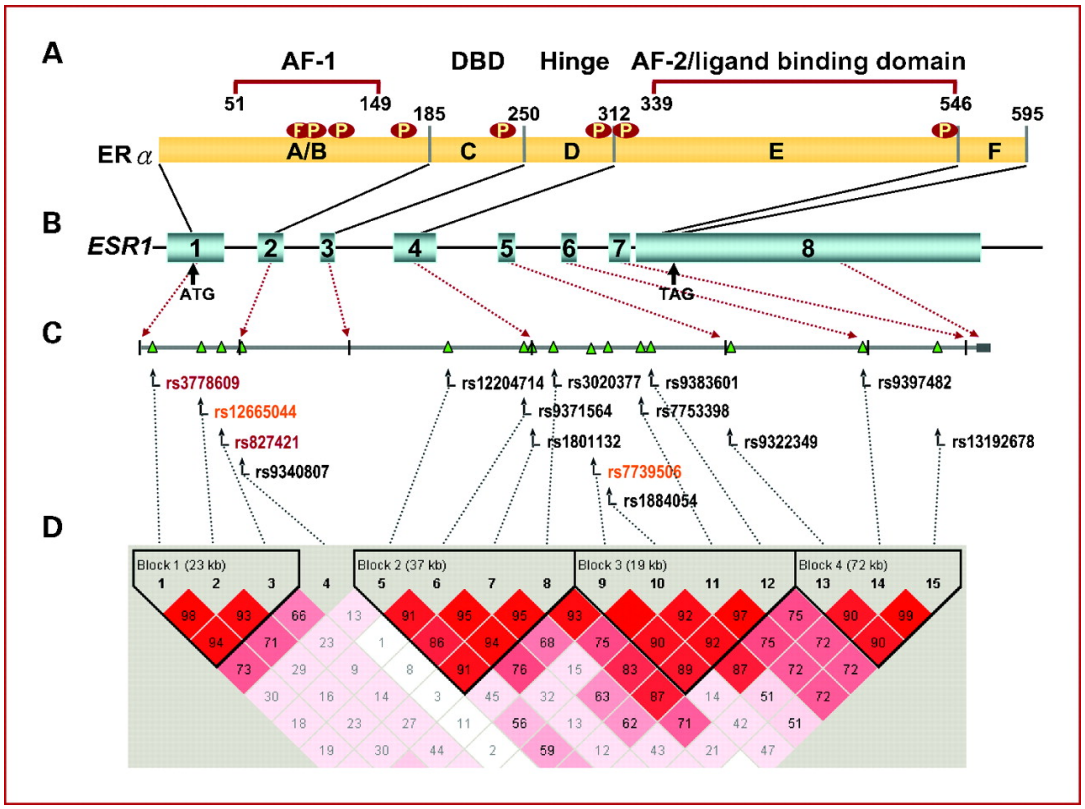
A estatística *r2*, também descrita na literatura como D2, é a correlação ao quadrado entre a presença e a ausência de alelos em diferentes *loci* (Hill e Robertson, 1968):

$$r^2 = \frac{(D_{ab})^2}{\pi_A \pi_a \pi_B \pi_b}$$

$$[D'] = \frac{(D_{ab})^2}{\min(\pi_A \pi_a \pi_B \pi_b)}, \text{ se } D_{ab} < 0;$$

$$[D'] = \frac{(D_{ab})^2}{\min(\pi_A \pi_a \pi_B \pi_b)}, \text{ se } D_{ab} > 0;$$

O valor absoluto |*D'*| varia de 0 a 1. Somente quando forem observados todos os quatro possíveis haplótipos (*pAB*, *pAb*, *paB* e *pab*) é que *D'* será inferior a 1. Nesse caso, consequentemente, um suposto evento de recombinação terá ocorrido entre os dois *loci*. Sempre que uma das quatro frequências haplotípicas for zero, |*D'*| será igual a 1, o que ocorre com frequência, quando se trabalha com populações pequenas (Wray e Visscher, 2008).




FONTE: Ding S et al., 2010.

**Figura 17. Diagramas esquemáticos de REα e o gene do receptor estrogênico 1 (ESR1). A) domínios funcionais REα. B) estrutura do *éxon* do ESR1. Os comprimentos das caixas de luz azul (*éxons*) e linhas pretas (*íntrons)* são proporcionais ao tamanho (isto é, pares de base) do *éxons* ou *íntrons*, no entanto, para refletir a relação entre as regiões exônicas (B) e seus domínios correspondentes (A), as escalas para os *éxons* e *íntrons* são diferentes. C) SNPs de ESR1 associados com o risco de câncer de mama; SNPs mostrando um efeito significativo (P <0,05) são mostrados em vermelho, e aqueles mostrando um efeito marginal (0,05 ≤ P <0,10) são na cor laranja. D) DL entre os SNPs genotipados de ESR1 em mulheres de controle de Taiwan. A força do DL entre SNPs, como indicado pelo esquema de cores, foi medida usando uma combinação de a estatística D pontuação (sombreado vermelho escuro D' = 1 ; luz vermelha sombreamento D '<1**

## 4.8 Método Estatístico

Os dados foram descritos utilizando-se média, desvio padrão (dp), mediana, frequência absoluta (n) e frequência relativa (%).

As análises realizadas utilizaram o programa estatístico *PASTversion* 2.15. Para análise do grau de concordância entre os dois observadores empregou-se o Teste de *McNemar*. A comparação de variáveis qualitativas, ou seja, frequências e proporções foram feitas através do teste Qui-quadrado; para as variáveis quantitativas foi utilizado o "Testes t". Quando se tratava de mais de duas variáveis aplicou-se o Teste de Análise de Variância (ANOVA).

O valor de significância estatístico foi estabelecido em 5%, ou seja, $p<0,05$.

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Caracterização da densidade mamográfica

A distribuição da densidade mamográfica, de acordo com os dois observadores, ficou determinada como mostra a figura 18. Das 317 mamografias classificadas como mamas densas pelo observador 1, de forma subjetiva (avaliação realizada pelo chefe do Setor de Radiologia do Hospital das Clinicas, professor Nestor de Barros), o observador 2 concordou com o padrão de densidade em 308 mamografias (avaliação objetiva, realizada através de planimetria computadorizada).

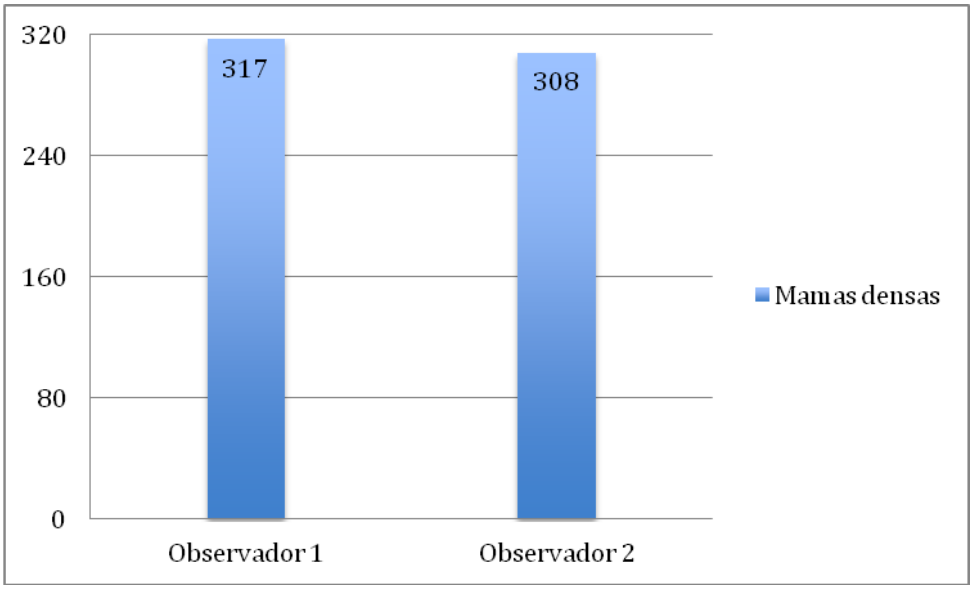



**Figura 18. Distribuição da densidade mamográfica em 317 mulheres após a menopausa, determinada por dois observadores independentes**
**Mamas densas (tecido fibroglandular ocupa acima de 50% da área total da mama).**
**Observador 1- chefe do Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas.**
**Observador 2- avaliação objetiva – planimetria computadorizada.**

Para análise do grau de concordância entre os dois observadores, foi utilizado o Teste de *McNemar* (Tabela 8).

**Tabela 8. Grau de concordância entre os dois observadores na determinação da densidade mamográfica, segundo os índices de correlação de *McNemar***

| Classificação subjetiva | Classificação objetiva | % de concordância |
|---|---|---|
| 317 | 308 | 97,16 (IC95% 94,68 - 98,69) |

Como foi encontrado alto grau de concordância entre os dois observadores, os valores de densidade utilizados como referência para as análises posteriores foram aquelas determinadas pelo observador objetivo, por não serem tendenciosa.

## 5.2 Características Clínicas

A série foi composta por 308 mulheres com mamas densas após a menopausa que preencheram os critérios de inclusão. Suas características clínicas foram analisadas e estão resumidas nas tabelas 9 (variáveis quantitativas) e 10 (variáveis qualitativas). A cor amarela teve poucas representantes (15 mulheres, 4,87%); a branca teve maior frequência (180 mulheres, 58,44%).

**Tabela 9. Descrição das variáveis quantitativas**

| Característica | Média | dp | mediana |
|---|---|---|---|
| Idade | 56,31 | 5,42 | 56,00 |
| Cintura Abdominal | 89,47 | 10,83 | 89,00 |
| Peso | 65,73 | 13,07 | 64,35 |
| Altura | 1,56 | 0,07 | 1,56 |

**Tabela 10. Descrição das variáveis qualitativas**

| **Característica** | | **n** | **%** |
|---|---|---|---|
| Cor da pele | Branca | 180 | 58,44 |
| | Parda | 67 | 21,75 |
| | Preta | 46 | 14,94 |
| | Amarela | 15 | 4,87 |
| Índice de Massa Corpórea (IMC) | Normal | 117 | 37,99 |
| | Sobrepeso/obesidade | 191 | 62,01 |
| Idade ao nascimento do 1º filho | Até 28 anos | 193 | 80,41 |
| | >28 anos | 47 | 19,58 |
| Menopausa | Até 50 anos | 231 | 75 |
| | >50 anos | 77 | 25 |
| Menarca | Até 12 anos | 109 | 35,38 |
| | >12 anos | 199 | 64,61 |
| Número de gravidez | 0 | 60 | 19,48 |
| | 1 - 3 | 166 | 53,90 |
| | > 3 | 82 | 26,62 |
| Número de partos (paridade) | 0 | 68 | 22,08 |
| | 1 - 3 | 198 | 64,29 |
| | > 3 | 42 | 13,64 |
| Fumo | Não | 264 | 85,71 |
| | Sim | 44 | 14,29 |
| Álcool | Não | 258 | 83,77 |
| | Sim | 50 | 16,23 |
| Síndrome metabólica | Não | 220 | 71,43 |
| | Sim | 88 | 28,57 |
| Antecedentes familiares de câncer de mama | Não | 249 | 80,84 |
| | Sim | 59 | 19,16 |

## 5.3 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Conforme são apresentados na tabela 11, os polimorfismos *Pvull* e *Xbal* encontram-se em equilíbrio de H-W na população em questão.

**Tabela 11. Distribuição dos polimorfismos com verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg***

| Polimorfismo | | Observado | | Esperado | | Equilíbrio de H-W |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | n | % | n | % | p |
| Pvu ll | *pp* | 100 | 32,47 | 97,7 | 31,73 | 0,600 ns |
| | *Pp* | 147 | 47,73 | 151,5 | 49,20 | |
| | *PP* | 61 | 19,81 | 58,7 | 19,07 | |
| | Freq. Alélica *p* | 347 | 56,33 | | | |
| | Freq. Alélica *P* | 269 | 43,67 | | | |
| Xba l | *xx* | 103 | 33,44 | 105,2 | 34,15 | 0,607 ns |
| | *Xx* | 154 | 50,00 | 149,6 | 48,57 | |
| | *XX* | 51 | 16,56 | 53,2 | 17,27 | |
| | Freq. Alélica *x* | 360 | 58,44 | | | |
| | Freq. Alélica *X* | 256 | 41,56 | | | |

n – diferença não significativa para o equilíbrio de H-W

A distribuição do polimorfismo de repetição *(GT)n* está representada na tabela 12.

**Tabela 12. Distribuição dos polimorfismos (GT)n**

| Polimorfismo | Número de repetições | n | % |
|---|---|---|---|
| (*GT*) n | 11 | 5 | 1,62 |
| | 12 | 10 | 3,25 |
| | 13 | 3 | 0,97 |
| | 14 | 37 | **12,01** |
| | 15 | 80 | **25,97** |
| | 16 | 118 | **38,31** |
| | 17 | 26 | 8,44 |
| | 18 | 15 | 4,87 |
| | 19 | 8 | 2,60 |
| | 20 | 2 | 0,65 |
| | 21 | 1 | 0,32 |
| | 22 | 3 | 0,97 |

## 5.4 Associação das características clínicas e polimorfismo do REα *Pvull, Xbal*

**Cor**

Na associação entre polimorfismo *Pvull* e cor não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. No grupo de homozigoto mutado (n=99), a cor amarela teve maior porcentagem de que as outras (46,67%), devendo-se, porém, considerar o pequeno número de mulheres nesse grupo (Tabela 13).

**Tabela 13. Associação entre polimorfismo *Pvull* e cor**

| Cor | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| Amarela | 7 | 46,67 | 8 | 53,33 | 15 | 4,87 |
| Branca | 55 | 30,56 | 125 | 69,44 | 180 | 58,44 |
| Preta | 14 | 30,44 | 32 | 69,56 | 46 | 14,94 |
| Parda | 23 | 34,33 | 44 | 65,67 | 67 | 21,75 |
| **Total** | **99** | **32,14** | **209** | **67,86** | **308** | **100** |

p = 0,618 – não significante

Quanto ao genótipo *Xbal*, também não foi apontado diferença significante em relação à cor. A cor preta foi a que teve menor frequência do gene homozigoto mutado (21,7%) e a cor parda, a maior (38,8%) (Tabela 14).

**Tabela 14. Associação entre polimorfismo *Xbal* e cor**

| Cor | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| Amarela | 5 | 33,3 | 10 | 66,67 | 15 | 4,87 |
| Branca | 62 | 34,44 | 118 | 65,56 | 180 | 58,44 |
| Preta | 10 | 21,74 | 36 | 78,26 | 46 | 14,94 |
| Parda | 26 | 38,81 | 41 | 61,19 | 67 | 21,75 |
| **Total** | **103** | **33,44** | **205** | **66,56** | **308** | **100** |

p = 0,286 – não significante

**Número de partos**

A associação entre o polimorfismo *Pvull* e *Xbal* com número de partos está apresentada nas tabelas 15 e 16. Não se observou diferença estatisticamente significante de acordo com esta classificação. No grupo homozigoto mutado do SNPs REα397, a porcentagem de nulíparas foi de 33,82%, enquanto que 28,57% tiveram mais que três partos a termo. Para o SNPs REα351, estes valores foram 36,76 % e 38,10%, respectivamente.

**Tabela 15. Associação entre polimorfismo *Pvull* e número de partos**

| Parto | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| 0 | 23 | 33,82 | 45 | 66,18 | 68 | 22,08 |
| 1 - 3 | 65 | 32,83 | 133 | 67,17 | 198 | 64,28 |
| > 3 | 12 | 28,57 | 30 | 71,43 | 42 | 13,64 |
| Total | 100 | 32,5 | 208 | 67,5 | 308 | 100 |

p = 0,835 – não significante

**Tabela 16. Associação entre polimorfismo *Xbal* e número de partos**

| Parto | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| 0 | 25 | 36,76 | 43 | 63,24 | 68 | 22,08 |
| 1 - 3 | 62 | 31,31 | 136 | 68,69 | 198 | 64,28 |
| > 3 | 16 | 38,10 | 26 | 61,90 | 42 | 13,64 |
| Total | 103 | 33,44 | 205 | 66,56 | 308 | 100 |

p = 0,563 – não significante

**Idade da menopausa**

Em valores absolutos, as pacientes que apresentaram o polimorfismo homozigoto mutado para *Pvull* tiveram idade da menopausa mais cedo (Tabela 17). Esta proporção não se manteve no polimorfismo *Xbal*, no qual, em valores absolutos, o genótipo homozigoto foi mais prevalente em mulheres com menopausa após os 50 anos (Tabela 18).

**Tabela 17. Associação entre polimorfismo *Pvull* e idade da menopausa**

| DUM | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| até 50a | 77 | 33,33 | 154 | 66,67 | 231 | 75% |
| > 50a | 23 | 29,97 | 54 | 70,13 | 77 | 25% |
| Total | 100 | 32,5 | 208 | 67,5 | 308 | 100 |

p = 0,574 – não significante

**Tabela 18. Associação entre polimorfismo *Xbal* e idade da menopausa**

| DUM | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| até 50a | 76 | 32,90 | 155 | 67,10 | 231 | 75% |
| > 50a | 27 | 35,06 | 50 | 64,94 | 77 | 25% |
| Total | 103 | 33,44 | 205 | 66,56 | 308 | 100 |

p = 0,727 – não significante

**Idade ao nascimento do primeiro filho**

Destaca-se que, em valores absolutos, das mulheres com o homozigoto mutado para o polimorfismo *Pvull*, 29,53% tiveram o 1º filho até os 28 anos e 42,55% após os 28 anos de idade (Tabela 19). Para o polimorfismo *Xbal,* as proporções nas duas faixas de idade foram muito próximas, 32,12 e 34,04, respectivamente (Tabela 20).

**Tabela 19. Associação entre polimorfismo *Pvull* e idade ao nascimento do primeiro filho**

| Idade 1º filho | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| até 28anos | 57 | 29,53 | 136 | 70,47 | 193 | 80,42 |
| > 28 anos | 20 | 42,55 | 27 | 57,45 | 47 | 19,58 |
| Total | 77 | 32,08 | 163 | 67,92 | 240 | 100 |

p = 0,086 – não significante

**Tabela 20. Associação entre polimorfismo *Xbal* e idade ao nascimento do primeiro filho**

| Idade 1º filho | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| até 28 anos | 62 | 32,12 | 131 | 67,88 | 193 | 80,42 |
| > 28 anos | 16 | 34,04 | 31 | 65,96 | 47 | 19,58 |
| Total | 78 | 32,50 | 162 | 67,50 | 240 | 100 |

p = 0,801 – não significante

### Idade da Menarca

Os valores obtidos na associação entre polimorfismo *Pvull* e idade da menarca foram semelhantes (Tabela 21), acontecendo o mesmo para o polimorfismo *Xbal* (Tabela 22).

**Tabela 21. Associação entre polimorfismo *Pvull* e idade da menarca**

| Menarca | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| até 12 anos | 36 | 33,03 | 73 | 67,97 | 109 | 35,39 |
| > 12 anos | 64 | 32,16 | 135 | 67,84 | 199 | 64,61 |
| Total | 100 | 32,47 | 208 | 67,53 | 308 | 100 |

p = 0,877 – não significante

**Tabela 22. Associação entre polimorfismo *Xbal* e idade da menarca**

| Menarca | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| até 12 anos | 37 | 33,94 | 72 | 66,06 | 109 | 35,39 |
| > 12 anos | 66 | 33,17 | 133 | 66,83 | 199 | 64,61 |
| Total | 103 | 33,44 | 205 | 66,56 | 308 | 100 |

p = 0,890 – não significante

### Hábito de fumar

Na observação das mulheres com o homozigoto *Pvull* mutado, 38,64% se declararam fumantes e 31,44% não fumavam (Tabela 23). A mesma proporção aconteceu para o *Xbal,* porém com valores mais próximos (Tabela 24).

**Tabela 23. Associação entre polimorfismo *Pvull* e hábito de fumar**

| Hábito de Fumar | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| Não | 83 | 31,44 | 181 | 68,56 | 264 | 85,71 |
| Sim | 17 | 38,64 | 27 | 61,36 | 44 | 14,29 |
| Total | 100 | 32,47 | 208 | 67,53 | 308 | 100 |

p = 0,345 – não significante

**Tabela 24. Associação entre polimorfismo *Xbal* e hábito de fumar**

| Hábito de Fumar | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| Não | 88 | 33,33 | 176 | 66,67 | 264 | 85,71 |
| Sim | 15 | 34,09 | 29 | 65,91 | 44 | 14,29 |
| Total | 103 | 33,44 | 205 | 66,56 | 308 | 100 |

p = 0,921 – não significante

**Ingestão de bebida alcoólica**

Na observação das mulheres com o homozigoto mutado *Pvull*, 34% se declararam usuárias de álcool e 32,27%, não (Tabela 25). Para o *Xbal,* considerando o homozigoto mutado, a maior proporção foi das mulheres que não usavam álcool (Tabela 26).

**Tabela 25. Associação entre polimorfismo *Pvull* e ingestão de bebida alcoólica**

| Bebida alcoólica | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| Não | 83 | 32,27 | 175 | 67,83 | 258 | 83,77 |
| Sim | 17 | 34,00 | 33 | 66,00 | 50 | 16,23 |
| Total | 100 | 32,50 | 208 | 67,50 | 308 | 100 |

p = 0,800 – não significante

**Tabela 26. Associação entre polimorfismo *Xbal* e ingestão de bebida alcoólica**

| Bebida alcoólica | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| Não | 87 | 33,72 | 171 | 66,28 | 258 | 83,77 |
| Sim | 16 | 32,00 | 34 | 68,00 | 50 | 16,23 |
| Total | 103 | 33,44 | 205 | 66,56 | 308 | 100 |

p = 0,813 – não significante

**Antecedentes familiares**

Os valores obtidos na associação dos polimorfismos mutados *Pvull* e *Xbal* e antecedentes familiares foram muito próximos. Nas duas análises, 28,81% das mulheres tinham antecedentes familiares com CM (tabelas 27 e 28).

**Tabela 27. Associação entre polimorfismo *Pvull* e antecedente familiar (AF)**

| AF | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| Não | 83 | 33,33 | 166 | 66,67 | 249 | 80,84 |
| Sim | 17 | **28,81** | 42 | 71,19 | 59 | 19,16 |
| Total | 100 | 32,47 | 208 | 67,53 | 308 | 100 |

p = 0,505 – não significante

**Tabela 28. Associação entre polimorfismo *Xbal* e antecedente familiar (AF)**

| AF | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | N | % |
| Não | 86 | 34,54 | 163 | 65,46 | 249 | 80,84 |
| Sim | 17 | **28,81** | 42 | 71,19 | 59 | 19,16 |
| Total | 103 | 33,44 | 205 | 66,56 | 308 | 100 |

p = 0,402 – não significante

### Índice de Massa Corpórea

Quanto ao Índice de Massa Corpórea, 39,32% das mulheres com o polimorfismo *Pvull* homozigoto mutado tinham peso normal (Tabela 29); para o *Xbal,* 35,07 % das mulheres tinham sobrepeso/obesidade (Tabela 30).

**Tabela 29. Associação entre polimorfismo *Pvull* e Índice de Massa corpórea (IMC)**

| IMC | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| Normal | 46 | 39,32 | 71 | 60,68 | 117 | 37,99 |
| Sobrepeso/ Obeso | 54 | 28,30 | 137 | 71,70 | 191 | 62,01 |
| Total | 100 | 32,46 | 208 | 67,55 | 308 | 100 |

p = 0,126 – não significante

**Tabela 30. Associação entre polimorfismo *Xbal* e Índice de Massa corpórea (IMC)**

| IMC | Homozigoto Mutado | | Homozigoto Selvagem + Heterozigoto | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| Normal | 36 | 30,76 | 81 | 69,23 | 117 | 37,99 |
| Sobrepeso/ Obeso | 67 | 35,07 | 124 | 64,92 | 191 | 62,01 |
| Total | 103 | 33,44 | 205 | 66,56 | 308 | 100 |

p = 0,563 – não significante

## 5.5 Associação das características clínicas e o polimorfismo de repetição (*GT*)n

### Cor

A Tabela 31 apresenta o *GT*14, *GT*15 e *GT*16. Observa-se que no *GT*15 a cor parda foi estatisticamente mais prevalente. No *GT*14 a cor amarela e no *GT*16 a branca foram a mais frequentes, porém sem diferenças estatísticas significativas.

**Tabela 31. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e cor**

| Cor | n | % | n | % | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | |
| Amarela | 12 | 80,00 | 3 | 20,00 | 0,649 |
| Branca | 160 | 88,89 | 20 | 11,11 | |
| Preta | 39 | 84,78 | 7 | 15,22 | |
| Parda | 60 | 89,55 | 7 | 10,45 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| Amarela | 13 | 86,67 | 2 | 13,33 | 0,013 |
| Branca | 142 | 78,89 | 38 | 21,11 | |
| Preta | 33 | 71,74 | 13 | 28,26 | |
| Parda | 40 | 59,70 | 27 | 40,30 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| Amarela | 11 | 73,33 | 4 | 26,67 | 0,277 |
| Branca | 103 | 57,22 | 77 | 42,78 | |
| Preta | 31 | 67,39 | 15 | 32,61 | |
| Parda | 45 | 67,16 | 22 | 32,84 | |

**Números de partos**

Na associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e número de partos (Tabela 32) observou-se que 41,18% das mulheres que não tiveram filhos eram *GT*16.

**Tabela 32. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e número de partos**

| Número de parto | n | % | n | % | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | |
| 0 | 61 | 89,71 | 7 | 10,29 | |
| 1 – 3 | 172 | 86,87 | 26 | 13,13 | 0,715 |
| > 3 | 38 | 90,48 | 4 | 9,52 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| 0 | 53 | 77,94 | 15 | 22,06 | |
| 1 – 3 | 145 | 73,23 | 53 | 26,67 | 0,686 |
| > 3 | 30 | 71,43 | 12 | 28,57 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| 0 | 40 | 58,82 | 28 | 41,18 | |
| 1 – 3 | 122 | 61,62 | 76 | 38,38 | 0,713 |
| > 3 | 28 | 66,66 | 14 | 33,34 | |

### Idade da menopausa

Na associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e idade por ocasião da última menstruação, a maior frequência foi o (*GT*)16, no qual constatou-se 39,00% das mulheres com data da menopausa até os 50 anos e 38,96, após os 50 anos (Tabela 33).

**Tabela 33. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15, (*GT*)16 e Idade da menopausa**

| DUM | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | |
| até 50 anos | 206 | 89,18 | 25 | 10,82 | 0,256 |
| > 50 anos | 65 | 84,42 | 12 | 15,58 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| até 50 anos | 167 | 72,3 | 64 | 27,7 | 0,230 |
| > 50 anos | 61 | 79,22 | 16 | 20,78 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| até 50 anos | 143 | 61,90 | 88 | 39,00 | 0,892 |
| > 50 anos | 47 | 61,04 | 30 | 38,96 | |

**Idade ao nascimento do primeiro filho**

O (*GT)*16 também se mostrou o mais frequente em relação à idade da mulher por ocasião do nascimento do 1º filho. 35,75% das mulheres tiveram o 1º filho até os 28 anos e 44,68% após os 28 anos. O (*GT*)14 foi o menos frequente para gravidez tardia (Tabela 34).

**Tabela 34. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e idade ao nascimento do 1º filho**

| 1o. Filho | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | |
| até 28 anos | 166 | 86,01 | 27 | 13,99 | 0,157 |
| > 28 anos | 44 | 93,62 | 3 | 6,38 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| até 28 anos | 139 | 72,02 | 54 | 27,98 | 0,527 |
| > 28 anos | 36 | 76,60 | 11 | 23,40 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| até 28 anos | 124 | 64,25 | 69 | 35,75 | 0,257 |
| > 28 anos | 26 | 55,32 | 21 | 44,68 | |

### Idade da menarca

Nenhum desses genótipos influenciaram na idade da menarca (Tabela 35).

**Tabela 35. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e idade da menarca**

| Menarca | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | |
| até 12 anos | 95 | 87,16 | 14 | 12,84 | 0,740 |
| > 12 anos | 176 | 88,44 | 23 | 11,56 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| até 12 anos | 84 | 77,06 | 25 | 22,94 | 0,368 |
| > 12 anos | 144 | 72,36 | 55 | 27,64 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| até 12 anos | 70 | 64,22 | 39 | 35,78 | 0,499 |
| > 12 anos | 120 | 60,30 | 79 | 39,70 | |

**Hábito de fumar e ingestão de bebida alcoólica**

Na associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e hábito de fumar (Tabela 36) e ingestão de bebida alcoólica (Tabela 37), observou-se que as maiores frequências foram do (*GT*)16 e (GT)15 com 43,18% e 31,82%, para o hábito de fumar, e, para a ingestão de bebida alcoólica, foram 34,00% e 30,00%, respectivamente.

**Tabela 36. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e hábito de fumar**

| Hábito de Fumar | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | |
| Não | 229 | 86,74 | 35 | 13,26 | 0,100 |
| Sim | 42 | 95,45 | 2 | 4,55 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| Não | 198 | 75,00 | 66 | 25,00 | 0,340 |
| Sim | 30 | 68,18 | 14 | 31,82 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| Não | 165 | 62,50 | 99 | 37,50 | 0,473 |
| Sim | 25 | 56,82 | 19 | 43,18 | |

**Tabela 37. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e ingestão de bebida alcoólica**

| Bebida Alcoólica | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | |
| Não | 225 | 87,21 | 33 | 12,79 | 0,340 |
| Sim | 46 | 92,0 | 4 | 8,00 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| Não | 193 | 74,81 | 65 | 25,19 | 0,478 |
| Sim | 35 | 70,00 | 15 | 30,00 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| Não | 157 | 60,85 | 101 | 39,15 | 0,493 |
| Sim | 33 | 66,00 | 17 | 34,00 | |

**Antecedentes familiares**

A maior frequência para o (*GT*)16 também foi observada na associação com antecedentes familiares (Tabela 38) e Índice de massa corpórea maior que 25 (Tabela 39).

**Tabela 38. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e antecedentes familiares (AF)**

| AF | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | |
| Não | 223 | 89,56 | 26 | 10,44 | 0,081 |
| Sim | 48 | 81,36 | 11 | 18,64 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| Não | 184 | 73,90 | 65 | 26,10 | 0,914 |
| Sim | 44 | 74,58 | 15 | 25,42 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| Não | 149 | 59,84 | 100 | 40,16 | 0,170 |
| Sim | 41 | 69,49 | 18 | 30,51 | |

**Tabela 39. Associação entre (*GT*)14, (*GT*)15 e (*GT*)16 e Índice de Massa corpórea (IMC)**

| IMC | n | % | n | % | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| | (*GT*) não 14 | | (*GT*) 14 | | |
| Normal | 104 | 88,89 | 13 | 11,11 | |
| Sobrepeso | 69 | 88,46 | 9 | 11,54 | 0,871 |
| Obeso | 98 | 86,67 | 15 | 13,27 | |
| | (*GT*) não 15 | | (*GT*) 15 | | |
| Normal | 87 | 74,36 | 30 | 25,64 | |
| Sobrepeso | 57 | 73,08 | 21 | 26,92 | 0,976 |
| Obeso | 84 | 74,34 | 29 | 25,66 | |
| | (*GT*) não 16 | | (*GT*) 16 | | |
| Normal | 72 | 61,54 | 45 | 38,46 | |
| Sobrepeso | 46 | 58,97 | 32 | 41,03 | 0,802 |
| Obeso | 72 | 63,72 | 41 | 36,28 | |

## 5.6 Distribuição dos haplótipos

A análise mostrou desequilíbrio de ligação (D' e $r^2$) entre os polimorfismos *Pvull* e *Xbal*. Os valores de D' e $r^2$ são os seguintes:

***Pvull* x *Xbal* →D´ = 0,396 ou 39,6%**

***$r^2$ = 0,14***

A distribuição dos haplótipos está apresentada na tabela 40.

**Tabela 40. Frequência dos haplótipos *Pvull* x *Xbal***

| *PX* | | *Px* | | *pX* | | *px* | | TOTAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 166 | 53,90 | 42 | 13,63 | 38 | 12,34 | 62 | 20,13 | 308 | 100 |

Definição e frequência obtida no presente estudo:

*PX:* ***PPXX* (n=45; 14,61%),** *PPXx* (n=12; 3,90%), *PpXX* (n=6; 1,95%), *PpXx* (n=103; 33,44%)

*Px: PPxx* (n= 4; 1,3%), Ppxx (n=38; 12,34%)

*pX: ppXX* (n= 0; 0%), ppXx (n=38; 12,34%)

***px: ppxx* (n=62; 20,13%)**

# 6 DISCUSSÃO

Atualmente, há fortes evidências que a DM seja um fator de risco independente para o CM. Apresenta índice elevado (risco relativo de 2 a 6), sendo comparável a outros fatores de risco, tais como: hiperplasia epitelial atípica, mãe e irmã com CM e suscetibilidade genética comprovada, superando fatores como nuliparidade, antecedente de hiperplasia sem atipias, menopausa tardia e menarca precoce (Martin e Boyd, 2008).

A DM reflete a variação nos tecidos que compõem a mama, estando positivamente associada ao colágeno e células epiteliais e não epiteliais (imagem branca), e, negativamente, com a gordura (imagem escura).

Acredita-se que o padrão mamográfico seja multifatorial e sofra influência da idade, fatores reprodutivos, idade da menarca, estado menopausal, antecedente familiar, hábito alimentar, sedentarismo, terapia hormonal e ingestão alcoólica excessiva. Estes fatores, porém, explicam somente 20 a 30% das variações da DM (Boyd et al., 2010). Estudos em gêmeos monozigóticos demonstram que a hereditariedade resulta em 60% da DM (Vachon et al., 2000). Entre as potenciais influências genéticas, observa-se que a combinação de efeitos proliferativos nas células (mitogênicos) e danos genéticos (mutagênicos) podem ser a base do aumento de risco para o CM e alta DM (Martin e Boyd, 2008). Há clara necessidade de se melhorar o entendimento dos fatores específicos que estão envolvidos nesse processo e do papel dos fatores de crescimento tão bem quanto das intervenções hormonais nos vários componentes do tecido mamário. Em particular, é provável que a identificação dos genes, que são responsáveis pela variação na porcentagem entre os diversos tecidos da mama (e suas funções biológicas), possa fornecer luz dentro da biologia da mama e identificar marcadores potenciais para prevenção do CM.

## 6.1 Fatores clínicos associados ao câncer de mama e densidade mamográfica

A idade continua sendo o principal fator de risco para o CM; as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, ocorre de forma mais lenta. O oposto acontece com a DM, que declina com a idade. Isto parece paradoxal, no entanto pode ser explicado pelo modelo de Pike et al., 1983. Este modelo é baseado no conceito de tempo durante a vida que o tecido mamário é exposto à maior densidade e atividade mitogênica. Portanto, a persistência da elevada DM ao longo da vida seria responsável pela maior incidência do CM. Em jovens, habitualmente as mamas são densas e progressivamente sofrem involução com o decorrer da idade. Essa involução, entretanto, não é padrão em todas as mulheres e, segundo Stomper et al., 1996, 36% das mulheres de 55 a 59 anos possuem mamas densas.

Em nosso estudo, a amostra foi composta de mulheres com idade entre 45 a 65 anos (média de 56,31, dp de 5,42 e mediana de 56), com mamas densas após a menopausa. Durante a fase de seleção das pacientes no Setor de Radiologia do Hospital da Clínicas (INRAD), das 1200 mulheres que preenchiam os critérios de inclusão, 384 (32%) tinham mamas densas, confirmando os dados observados na literatura (Stomper et al, 1996).

Com a redução da taxa de estrogênio e progesterona, após a menopausa, o processo cíclico proliferativo celular torna-se quiescente e a imagem mamográfica torna-se, rapidamente, radiolucente. A cada dois anos de menopausa, a DM diminui em 9% (Boyd et al., 1997). Na presente pesquisa, as mulheres mostraram ter menopausa relativamente precoce, com média de idade de 46,45 anos (dp de 6,33), não caracterizando fator de risco para alta DM. Apenas 25% das mulheres (77) tiveram DUM após 50 anos de idade (Tabela 10) e somente 4,55% destas (14), com 55 anos ou mais. O tempo médio decorrido desde a menopausa até a realização dos exames foi de 9,91 anos (dp de 7,38).

Estes dados também coincidem com os registrados por Pinho e Coutinho, 2007, em seu estudo sobre prevalência dos fatores de risco para CM na população

brasileira, no qual apenas 4,4% das mulheres entrevistadas tiveram menopausa após os 55 anos de idade. Matos et al. (2010) também não encontraram como fator de risco para CM, a idade da menopausa (media etária de 47 anos).

Idade da menarca está associada tanto à exposição aos hormônios ovarianos quanto a fatores nutricionais da adolescente. Mulheres com menarca antes dos 12 anos de idade possuem risco 20% maior de desenvolver CM ao longo da vida em comparação àquelas com mais de 14 anos. Menarca tardia (≥15 anos) diminui o risco para essa neoplasia em 28% quando comparadas àquelas abaixo de 12 anos (Pike et al., 1983). Outros estudos não encontraram associação entre DM e idade da menarca, sugerindo que o mecanismo pelo qual a menarca precoce aumenta o risco de câncer de mama não seja pela via da densidade mamográfica (Jeon et al., 2011; Butler et al., 2008; Ramos et al., 2009). Em nosso estudo, a prevalência da menarca precoce (até 12 anos) foi de 35%, maior que os valores encontrados por Pinho e Coutinho (2007) e Lamas e Pereira (1999) sobre as variáveis associadas ao câncer de mama, 22,4% e 29,3%, respectivamente.

Aumento da DM está associado com nuliparidade e idade tardia do primeiro parto a termo. Cada nascimento reduz o risco de CM ($RE^+$ e $RP^+$) em 11%, e mulheres com idade tardia do nascimento do primeiro filho (≥35 anos) tiveram 27% maior risco de desenvolver CM que aquelas que tiveram o primeiro filho antes dos 20 anos de idade (Ma et al., 2006). Porém, em pesquisas na população brasileira, os fatores reprodutivos não foram relevantes em relação ao CM (Matos et al., 2010; Pinho & Coutinho, 2005). Pinho e Coutinho (2007) encontraram gravidez após os 30 anos em apenas 5,3%. Em nosso grupo, 19,58% (47) tiveram o primeiro filho acima dos 28 anos de idade e 13,31% (41), com 30 anos ou mais, 22,08% (68) não tiveram filhos e apenas 13,64% tiveram mais que três partos a termo.

Quanto à etnia/cor, a mortalidade por CM varia consideravelmente entre diferentes grupos étnicos (Ghafoor et al., 2003). Nos EUA, a incidência é maior entre os caucasianos e afro-americanos; intermediária entre os hispânicos e ameríndios; e menor entre os asiáticos (*American Cancer Society*, 2012). No Brasil, a miscigenação da população influi na incidência da doença (Hallal et al., 2007); embora vários pesquisadores tenham encontrado maior prevalência do CM na cor

branca (Sclowitz et al., 2005). No nosso grupo, a maior representação de mamas densas foi na cor branca (58,44%) seguida pela parda (21,75%).

A história familiar de CM em parentes de primeiro grau tem sido relatada em muitos estudos como forte fator de risco para essa doença. Há, também, evidências que a DM pode ser hereditária. Boyd et al. (2010) encontraram associação positiva entre história familiar de CM e maior DM. No Brasil, em revisão bibliográfica realizada por Pinho e Coutinho (2007), a prevalência de história familiar de CM em parentes de primeiro grau na população feminina brasileira foi de 4%. Nossos resultados apontam que 19% das pacientes relataram ter história de CM em parentes de primeiro grau, mostrando maior prevalência deste fator de risco nessa população, sugerindo maior influência genética na DM, concordando com os dados da literatura.

As informações sobre hábito de fumar e consumo de bebidas alcoólicas foram obtidas, sendo que 14,29% de mulheres se declararam fumantes, e 16,23% ingeriam, pelo menos, uma dose de bebida alcoólica por dia. Alta ingesta de álcool foi associada com o aumento da DM por Vanchon et al., 2007; Herrinton et al., 1993. Matos et al. (2010) em pesquisa de prevalência de fatores de risco em mulheres com CM, observaram que 13% eram fumantes e 21,2% bebiam socialmente. No entanto, análise colaborativa de 53 estudos epidemiológicos mostraram que o tabagismo possui pouco ou nenhum efeito no risco de desenvolvimento do CM. Meta-análise de dados de 40 estudos estimou que mulheres não alcoólatras comparadas com mulheres que consomem uma dose por dia (12g) tinham 10% no aumento de risco de CM (Ellison et al., 2001).

Obesidade é fator de risco conhecido para CM em mulheres após a menopausa, especialmente quando se examina a relação entre IMC em associação com a DM e CM (Lam et al., 2000). Mulheres com IMC alto apresentam menor probabilidade de terem mamas densas, no entanto, o risco para desenvolvimento de CM em mulheres com peso acima de 81 Kg quando comparadas àquelas com peso inferior a 63 Kg foi de OR=1,7. Porém, após ajustes para densidade mamográfica, a OR aumentou para 2,1. Este aumento indica que densidade é um fator de risco independente e que mulher obesa com mamas densas tem acréscimo no risco de desenvolver CM. Sugere-se, ainda que, para cada 5,00 Kg de peso adquirido na vida

adulta, o risco de desenvolver CM aumenta em 8% (Trentham-Dietz et al., 2000). Alta ingesta calórica, especialmente de gorduras saturadas, relaciona-se a aumento do risco para CM, e modificações na dieta, limitando o consumo de gorduras saturadas e carboidratos, podem diminuir a DM e o risco de CM (Boyd et al., 1997). Nossos dados apontam alta prevalência de obesidade e sobrepeso, 36,69% e 25,32%, respectivamente; ou seja 62,01% das mulheres com mamas densas e IMC≥25, um dado surpreendente e preocupante que merece atenção e investigação.

## 6.2 Densidade mamográfica e polimorfismo do gene do receptor estrogênico

Baseando-se em evidências epidemiológicas que correlacionam hormônios esteroides às mudanças na DM, tem se analisado se variações nos genes que regulam a biossíntese e metabolismo hormonal poderiam explicar as diferenças individuais na DM. O gene do RE, localizado no braço longo do cromossomo 6q25, tem sido associado à DM em vários estudos, devido à sua importância no desenvolvimento, progressão e prognóstico do CM.

Há vários polimorfismos conhecidos, no gene do REα, entre os quais estão o SNPs *Pvull* e *Xbal* e, mais recentemente, o polimorfismo de repetição (*GT*)n. Os polimorfismos *Pvull* e *Xbal* estão localizados no intron 1 do gene do REα, com 50 pares de bases entre eles. O polimorfismo de repetição $(GT)_n$ [STRs $(GT)_n$] está localizado a 6627 pb anterior à região de início do sítio de transcrição do *éxon* 1 a 144 kb do *éxon* 2.

Várias doenças, incluindo câncer de mama (Yaich et al., 1992; Parl et al., 1989; Andersen et al., 1994; Shin et al., 2003; Cai et al., 2003[A]), câncer endometrial (Weiderpass et al., 2000), doença de Alzheimer (Maruyama et al., 2000), obesidade (Speer et al., 2001), endometriose (Kitawaki et al., 2001), leiomiomas (Massart et al., 2001) e densidade mineral óssea (Genari et al., 2004), têm sido avaliadas pela possível ligação com os polimorfismos no gene do REα.

Parl et al. (1989) encontraram que o genótipo *pp* do *SNPs Pvull* foi maior em mulheres com diagnóstico de CM em idade mais jovem. Yaich et al. (1992) examinaram o polimorfismo *Pvull* em tecido tumoral de 257 mulheres com câncer primário de mama e colheram sangue periférico de 140 controles não acometidas pela doença. Mulheres com CM e genótipo *pp* tiveram o diagnóstico de CM em idade mais precoce quando comparadas com aquelas com genótipo *PP* ou *Pp* do grupo que tiveram câncer. Investigando a frequência alélica do SNPs *Pvull* e *Xbal* em 360 casos de CM e 672 controles, Andersen et al. (1994) encontraram diferenças significativas somente para o polimorfismo *Xbal.* A frequência do alelo *x* entre as mulheres com CM foi de 1,4 vezes maior em comparação com os controles. Para as mulheres com mamas densas, os nossos dados apontam 32,14% com genótipo *pp* e 20,13% com *PP*, portanto, numa proporção de 1,6 para 1, respectivamente.

Em estudo caso-controle conduzido na Coreia do Sul por Shin et al. (2003), a OR associada com o genótipo *xx* de *Xbal* foi de 2,38 comparado ao genótipo *XX*. Cai et al. (2003[A]), em grande estudo populacional, encontraram significante associação do polimorfismo *Pvull* e CM (OR=1,4) e, para *SNPs Xbal,* a associação de risco foi de 1,3 e somente para mulheres após a menopausa. Nesse mesmo sentido, van Duijnhoven et al. (2006), estudando a influência do REα e TH na DM, relataram associação entre o aumento da densidade e presença do genótipo REα-397 (OR= 2,24) em mulheres usuárias de TH, comparadas àquelas com genótipo selvagem e não usuárias de TH.

Por outro lado, Dunning et al. (1999), em revisão sistemática de estudos caso-controle, notaram que não houve associação significativa entre SNPs *Xbal* e *Pvull* e CM (p=0,06 e p=0,36, respectivamente), porém os autores ressaltaram que não estratificaram as mulheres com base em seus níveis estrogênicos e idade.

Da mesma forma, Dumas e Diorio (2010) também não encontraram diferenças significativas entre DM e estes polimorfismos, no entanto, em seu estudo, incluíram somente as mulheres na pré menopausa. No ano seguinte, em 2011, as mesmas autoras, em revisão sistemática, avaliaram essas variantes alélicas e DM, desta vez, estratificando as mulheres para alto nível de estrogênio, então, encontraram associação positiva.

Os mecanismos moleculares pelos quais estes polimorfismos modificam a atividade do receptor não estão claros, pois *Pvull* e *Xbal* localizam-se em uma região intrônica e, aparentemente, não funcional do gene. Explicações possíveis incluem existência de combinação funcional entre os alelos polimórficos, onde os dois marcadores em combinação alterariam a função genética, bem como a estabilidade do RNA (Wedrén et al., 2004).

Outra explicação seria que polimorfismos no *íntron* poderiam ter uma ligação de desequilíbrio (LD) com o *éxon*, a qual afetaria a função do RE (Genari et al., 2004). A esse respeito, tem-se pesquisado se polimorfismos no *íntron* 1 estão em LD com polimorfismo de repetição (*GT*)n localizado a 6627 pares de bases após o início do si,tio de transcrição do *éxon* 1 e a 144kb antes do *éxon* 2.

Em nosso estudo as frequências alélicas e genotípicas obtidas para o polimorfismo REα-397-*Pvull* (P=43,99%; p=56,01%) foram semelhantes às encontradas em outros estudos que correlacionaram este polimorfismo com DM ou CM (González-Mancha et al., 2008; Hu et al., 2007; Onland et al., 2005; van Duijnhoven et al., 2006; Hsieh et al., 2007, Giacomazzi et al., 2008) (Tabela 41).

A distribuição genotípica estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg com as seguintes frequências: genótipo *pp* 32,14%; *Pp* 47,73% e *PP* 20,13% (Tabela 11). As frequências alélicas para o polimorfismo *Xbal* (*X*= 41,56%; *x*= 58,44%), porém foram menores quando comparadas com outros dois estudos realizados na população brasileira (Ramos et al., 2009; Giacomazzi et al., 2008), mas estiveram de acordo com a frequência encontrada por van Duijnhoven et al. (2006), por Molvarec et al. (2007) e Hsieh et al. (2007) (Tabela 42).

A distribuição genotípica para ERα-351 *Xbal* também estava em equilibrio de *Hardy-Weinberg* com as seguintes frequências: genótipo *xx* 33,44%; *Xx* 50,00% e *XX* 16,56% (Tabela 11).

**Tabela 41. Frequência *REα*-397 *Pvull C/T* neste e em outros estudos**

| Frequência genotípica | | | Frequência alélica | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***pp*- n(%)** | ***Pp* – n(%)** | ***PP*–n (%)** | ***p* (%)** | ***P* (%)** | **n** | **p-value** | **País** | **Referências** |
| **100 (32,47)** | **147 (47,73)** | **61 (19,81)** | **0,56** | **0,44** | **308** | **0,6** | **Brasil** | **Este estudo** |
| 242 (32.3) | 356 (47.5) | 152 (20.2) | 0.56 | 0.44 | 750 | | Brasil | Giacomazzi 2008 |
| 64 (32.8) | 105 (53.9) | 26 (13.3) | 0.59 | 0.41 | 195 | 0.07 | Korea | Shin et al. 2003 |
| 61 (40.7) | 61 (40.7) | 28 (18.6) | 0.61 | 0.39 | 150 | 0.13 | Shangai | Shen et al. 2006 |
| 88 (21.0) | 153 (36.4) | 96 (22.9) | 0.49 | 0.51 | 337 | <0.001 | Denmark | Onland-Moret et al. 2005 |
| 208 (26.8) | 402 (51.8) | 166 (21.4) | 0.53 | 0.47 | 776 | <0.001 | Holand | van Duijnhoven et al. 2006 |
| 207 (26.7) | 385 (49.7) | 183 (23.6) | 0.51 | 0.49 | 775 | <0.001 | Holand | van Duijnhoven et al. 2006 |
| 21 (32.8) | 32 (40.7) | 11 (17.2) | 0.58 | 0.42 | 64 | 0.10 | Poland | Jakimiuk et al. 2007 |
| 49 (43.4) | 45 (39.8) | 19 (16.8) | 0.64 | 0.36 | 113 | <0.001 | China | Hu et al. 2007 |
| 27 (24.1) | 68 (40.7) | 17 (15.2) | 0.54 | 0.46 | 112 | <0.001 | China | Hsieh et al. 2007 |
| 60 (54.5) | 44 (40.7) | 6 (5.5) | 0.75 | 0.25 | 110 | 0.08 | China | Hsieh et al. 2007 |
| 25 (23.6) | 75 (70.8) | 6 (5.6) | 0.59 | 0.41 | 106 | <0.001 | China | Hsieh et al. 2007 |
| 29 (26.4) | 50 (45.4) | 31 (28.2) | 0.51 | 0.49 | 110 | <0.001 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 45 (25.0) | 94 (52.2) | 41 (22.8) | 0.51 | 0.49 | 180 | <0.001 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 16 (28.6) | 28 (50.0) | 12 (21,4) | 0.54 | 0.46 | 56 | 0.02 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 7 (33.3) | 8 (38.1) | 6 (28.6) | 0.52 | 0.48 | 21 | 0.07 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 3 (27.3) | 7 (63.6) | 1 (9.1) | 0.59 | 0.41 | 11 | 0.51 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |

**Tabela 42. Frequência do *REα*-351 *Xbal A/G* neste e em outros estudos**

| Frequência genotípica | | | Frequência alélica | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **xx- n(%)** | **Xx– n(%)** | **XX–n (%)** | **x (%)** | **X (%)** | **n** | **p-value** | **País** | **Referências** |
| **103 (33,44)** | **154 (50,00)** | **51 (16,56)** | **0,58** | **0,42** | **308** | **0,6** | **Brasil** | **Este estudo** |
| 347 (46.3) | 313 (41.7) | 90 (12.0) | 0.67 | 0.33 | 750 | | Brasil | Giacomazzi 2008 |
| 21 (17,5) | 45 (37,5) | 54 (45,0) | 0,64 | 036 | 120 | 0,18 | Brasil | Ramos et al. 2009 |
| 86 (44.1) | 102 (52.3) | 7 (3.6) | 0.70 | 0.30 | 195 | 0.001 | Korea | Shin et al. 2003 |
| 92 (61.4) | 47 (31.3) | 11 (7.3) | 0.77 | 0.33 | 150 | 0.003 | Shangai | Shen et al. 2006 |
| 123 (29.3) | 151 (36.0) | 61 (14.5) | 0.60 | 0.40 | 335 | 0.003 | Denmark | Onland-Moret et al. 2005 |
| 41 (32.0) | 362 (46.4) | 98 (12.6) | 0.56 | 0.44 | 780 | 0.02 | Holand | van Duijnhoven et al. 2006 |
| 308 (39.7) | 371 (47.9) | 96 (12.4) | 0.64 | 0.36 | 775 | 0.007 | Holand | van Duijnhoven et al. 2006 |
| 38 (59.4) | 22 (34.4) | 4 (6.25) | 0.77 | 0.33 | 64 | 0.10 | Poland | Jakimiuk et al. 2007 |
| 68 (61.8) | 35 (31.8) | 7 (6.4) | 0.77 | 0.33 | 110 | 0.007 | China | Hu et al. 2007 |
| 30 (26.8) | 64 (57.1) | 18 (16.1) | 0.55 | 0.45 | 112 | 0.001 | China | Hsieh et al. 2007 |
| 37 (33.6) | 71 (64.6) | 2 (1.8) | 0.66 | 0.34 | 220 | <0.001 | China | Hsieh et al. 2007 |
| 21 (19.8) | 56 (52.8) | 29 (27.4) | 0.59 | 0.41 | 106 | <0.001 | China | Hsieh et al. 2007 |
| 15 (24.6) | 31 (50.8) | 15 (24.6) | 0.50 | 0.50 | 61 | 0.001 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 23 (39.7) | 31 (53.4) | 4 (6.9) | 0.66 | 0.34 | 58 | 0.18 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 41 (37.3) | 47 (42.7) | 22 (20.0) | 0.59 | 0.41 | 110 | 0.04 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 60 (33.3) | 93 (51.7) | 27 (15.0) | 0.59 | 0.41 | 180 | 0.007 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 19 (33.9) | 29 (51.8) | 8 (14.3) | 0.60 | 0.40 | 56 | 0.20 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 7 (33.3) | 10 (47.6) | 4 (19.1) | 0.57 | 0.43 | 21 | 0.42 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |
| 4 (36.4) | 6 (54.5) | 1 (9.1) | 0.36 | 0.36 | 11 | 0.69 | Hungary | Molvarec et al. 2007 |

Em relação aos fatores de risco conhecidos para CM e DM, observamos, em nosso estudo, que o genótipo homozigoto recessivo para *Pvull* foi influenciado principalmente por fatores reprodutivos. No grupo homozigoto mutado (*pp*), a porcentagem de nulíparas e de mulheres que tiveram o primeiro filho a termo após os 28 anos de idade foi de 33,82% e, 42,55%, respectivamente (Tabelas 15 e19). De acordo com a literatura, mulheres nulíparas apresentam risco de CM igual àquelas

com nascimento do primeiro filho após os 28 anos (Ma et al, 2006). Este genótipo, em valores absolutos, apresentou menopausa mais cedo (antes dos 50 anos de idade) (Tabela 17). Este dado está de acordo com o publicado por Gonzales-Mancha et al. em 2008, onde os pesquisadores associaram SNPs *Pvull* e CM, em mulheres com idade média da menopausa de 47,94 anos.

Entre os fatores de risco para CM ditos modificáveis (tabagismo, alcoolismo e obesidade/sobrepeso) estiveram presentes genótipo *pp* 38,64%, 34,00% e 28,30% e no genótipo *xx* 34,01%, 32,00% e 35,07%, respectivamente, sugerindo que fatores ambientais (mitogênicos/mutagênicos) podem interferir nesse processo causando dano ao DNA (Tabelas 23 a 26, 29 e 30). Obesidade é o mais importante determinante do nível estrogênico em mulheres após a menopausa e está associada com aumento do risco de CM e pior prognóstico após início da doença (Pichard et al 2008). O risco relativo para mulheres obesas (RR= 1,1- 2,0) é comparável àqueles da TH (American Cancer Society). Em nosso estudo sobrepeso/obesidade foi muito prevalente sendo que, no grupo mutado (*pp* e *xx*), foi de 28,30% e 35,072%, respectivamente, fator que pode ter influenciado nessa alta prevalência de mulheres obesas em grupo composto apenas por mulheres com mamas densas. Como se sabe, em pesquisas prévias, a obesidade é um fator determinante importante para mamas não densas (Jeon et al., 2011; Ramos et al., 2009).

Um dado que chama atenção é referente à história familiar de CM. Na amostra total,19,16% (Tabela 10) tiveram um parente de primeiro grau com CM, e, quando estratificamos para *Pvull* e *Xbal,* essa porcentagem sobe para 28,81% (Tabelas 27 e 28). Esse dado mostra a importância do fator hereditário do polimorfismo que está de acordo com a literatura como observado por Shen et al. em 2006, os quais encontraram associação positiva desses polimorfismos somente em mulheres com AF para CM: genótipo *pp* sem AF/com AF com OR=1,12 e 3,04 e *xx* com OR= 0,99 e 4,20, respectivamente.

Para o polimorfismo *Xbal,* os fatores reprodutivos também foram mais prevalentes em números absolutos, porém sem diferença estatística significativa. Nuliparidade 36,76% (Tabela 16) e idade ao ter o primeiro filho maior que 28 anos 34,04% (Tabela 20). Diferente do *Pvull*, a menopausa após os 50 anos esteve

presente em 35,06% nesse genótipo, contra 32,90% antes dos 50 anos (Tabela 18). Javet et al., em estudo caso controle em 2011, combinaram os efeitos da idade da menopausa, polimorfismos *Xbal* e *Pvull* e a ocorrência de CM, e concluíram que o genótipo *Xbal* foi 45% maior nos casos de CM.

Investigando a combinação dos polimorfismos *Pvull* e *Xbal,* verificou-se que estes estavam em desequilíbrio ligação (D'= 0,396). Observou-se que o haplótipo *ppxx* (20,13%), que teoricamente é o de maior risco para o aumento de DM e CM, foi mais prevalente que o haplótipo de menor risco *PPXX* (14,61%).

Quanto ao polimorfismo de repetição SRTs $(GT)_n$, um total de 11 genótipos foi observado em nossa amostra $(GT_{11}$ *ao* $GT_{22})$. Entre eles as repetições mais comuns foram as $(GT)_{14}$, $(GT)_{15}$, $(GT)_{16}$ *e* $(GT)_{17}$, com 12,01%; 25,97%; 38,31%, 8,44%, respectivamente (Tabela 12). Estudos prévios observaram que polimorfismos de repetição em regiões promotoras podem ter significante influência na regulação da transcrição. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por outro grupo de pesquisadores com maior frequência para o genótipo 16, porém sem diferenças estatísticas entre casos de CM e os controles, 41,5% e 37,6%, respectivamente; a genotipagem, contendo $(GT)_{17}$ ou $(GT)_{18}$, foi associada com diminuição do risco de CM (OR=0,58), principalmente entre as mulheres após a menopausa, com receptor de progesterona negativo e que tiveram mais que 30 anos de ciclos menstruais (Cai et al., 2003[B]). Genari et al (2004) mostraram que menor número de repetições foram associadas com menor densidade mineral óssea e com maior risco de osteoporose. Boyapati et al. (2005), pesquisando se os polimorfismos *Pvull*, *Xbal* e *GT* modificariam a sobrevida de mulheres com CM, encontraram que a associação genotípica foi modificada pelo estados RE negativo ou RE positivo. Comparando aquelas com genótipo *pp* e o risco de morte foi de RR= 3,30 e 0,54 para participantes com RE- e RE+, respectivamente. Similarmente, mulheres que carreavam o polimorfismo de repetição $GT_{23}$ foram fortemente relacionadas a tumores de mama RE- (RR= 1,48 para RE-; e RR= 0,25 para RE+).

A presente pesquisa atendeu a um grupo amostral específico: mulheres com amenorreia por tempo maior ou igual há um ano, com idade 45 a 65 anos, com mamas densas, que não faziam uso de qualquer medicação hormonal há pelo menos

um ano; assim, as igualdades estatísticas obtidas nas diferentes associações propostas se justificam e sugerem ainda, que estes resultados sejam comparados a outros grupos de mulheres com mamas não densas. Como apresentado, a maioria dos resultados estão em concordância com os da literatura disponível, que se dedica a pesquisar relações importantes entre a densidade mamária e câncer de mama, e constitui nova contribuição para aumentar a segurança nas afirmações.

# 7 CONCLUSÕES

Em mulheres com mamas densas após a menopausa concluímos:

1) Os fatores considerados de risco para o câncer de mama, ou seja, menarca antes dos 12 anos, nuliparidade ou idade ao nascimento do primeiro filho após os 28 anos, história familiar de câncer de mama e sobrepeso/obesidade foram mais prevalentes nessa população. A etnia caucasiana foi a mais frequente, enquanto a menopausa tardia não se mostrou fator de influência;

2) As frequências alélica e genotípica obtida para o polimorfismo REα 397-*Pvull* foi semelhante à encontrada em outros estudos que correlacionaram este polimorfismo com densidade mamográfica ou câncer de mama, com as seguintes frequências: P=43,99%; p=56,01% e genótipo *pp* 32,14%; *Pp* 47,73% e *PP* 20,13% e mostrou-se em equilibrio de *Hardy-Weinberg*;

3) A frequência alélica e genotípica para o polimorfismo REα 351- *Xbal* esteve de acordo com a frequência encontrada na população de outros países, mas foi menor quando comparada com estudos realizados na população brasileira, com as seguintes frequências: *X*= 41,56%; *x*= 58,44% e genótipo *xx* 33,44%; *Xx* 50,00% e *XX* 16,56%. A distribuição do genótipo mostrou-se também em equilíbrio de *Hardy-Weinberg;*

4) Na distribuição dos haplótipos observou-se que o haplótipo *ppxx* (20,13%), o de maior risco para o aumento da densidade mamária e câncer de mama, foi mais prevalente que o de menor risco *PPXX* (14,61%). Concordando com a maioria dos estudos, o haplótipo *ppXX* não foi observado em nossa amostra revelando que o genótipo selvagem *XX* inativa essa combinação;

5) Na genotipagem dos microssatélites *(GT)n, as repetições* 14, 15 e 16 foram as mais frequentes, predominando a repetição 16;

5) As características clínicas idade da menarca, idade ao nascimento do primeiro filho, idade da menopausa, antecedente familiar, hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica e índice de massa corpórea não mostraram associação significante com os polimorfismos.

# 8 ANEXOS

**Anexo A –** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

**1.** NOME: .:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

**2**.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

## DADOS SOBRE A PESQUISA

**1**.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA. **DENSIDADE MAMÁRIA E POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR ESTROGÊNICO EM MULHERES COM MAMAS DENSAS APÓS MENOPAUSA**

PESQUISADOR : PROF ANGELA MAGGIO DA FONSECA, PROF EDMUND CHADA BARACAT .....

CARGO/FUNÇÃO: .PROF LIVRE DOCENTE EM GINECOLOGIA-OBSTETRÍCIA
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ..13553.....

UNIDADE DO HCFMUSP: GINECOLOGIA OBSTETRÍCIA .....

**3**. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO **X**☐ RISCO MAIOR ☐

**4**.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos..2009 - 2012.....

1- Este estudo tem como objetivo verificar a freqüência dos polimorfismos do gene do receptor estrogênico alfa em mulheres com mamas densas. Suas informações são voluntárias.

2- Serão averiguados o Peso, Altura, Circunferência abdominal e Pressão Arterial.

3- Serão realizados exames de rotina para a sua idade com o objetivo de afastar doenças e o câncer. **A senhora, também, irá coletar sangue para estudo genético**, com intuído de verificar possíveis risco para câncer de mama. Iremos fazer exame de mamografia. O sangue não será armazenado, e será desprezado após o termino dessa pesquisa.

4- O desconforto é mínimo, inerente a coleta de sangue e a mamografia .

5- Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo para observar a freqüência de variações polimórficas do receptor estrogênico em mulheres com mamas densas. Somente no final do estudo poderemos concluir se há ou não aumento de risco.

6- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora executante é a Dra Marilene Alícia Souza e a Dra Angela Maggio da Fonseca , que podem ser encontradas Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 255- Cerqueira

Cezar , ICHC-10 Andar- Sala 10173. Telefone 3069-7621.Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa , entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa ( CAPPesq )- Rua Ovídio Pires de Campos, 225- 5º andar- tel: 3069-6442 ramais 16, 17,18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26- email: cappesq@hcnet.usp.br

7- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento na instituição;

8- As informações obtidas são confidenciais e serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não será divulgado a identificação de nenhum paciente;

9- Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa;

10- Não há despesas pessoais para o participante, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

11- Os pesquisadores utilizarão os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito do que li, ou do que foram lidas para mim, descrevendo o estudo sobre polimorfismos (variações genéticas), como fator de risco para câncer de mama.

Eu discuti com a Dra.Marilene Alícia Souza sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

**Anexo B –** Aprovação pela Comissão de Ética para Projetos de Pesquisa – CAPPesq

# APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 18/01/2011, **APROVOU *ad-referendum* o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) referente ao Protocolo de Pesquisa nº **0297/09**, intitulado: "**OBESIDADE, COM E SEM SÍNDROME METABÓLICA, COMO FATOR DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA**", apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, bem como tomou ciência do relatório de andamento da pesquisa.

- **Carta datada de 25.10.10 - Emenda ao protocolo referente à alteração da casuística de 210 para 300 e alteração de título para "DENSIDADE MAMÁRIA E POLIMORFISMO DO RECEPTOR ESTROGÊNICO EM MULHERES NA PÓS MENOPAUSA COM MAMAS DENSAS"**

Pesquisador (a) Responsável: **PROFA. DRA. ANGELA MAGGIO DA FONSECA**
Pesquisador (a) Executante: **MARILENE ALICIA SOUZA**

CAPPesq, 18 de Janeiro de 2011

**PROF. DR. EDUARDO MASSAD**
**Presidente**
**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

**Anexo B** – Aprovação do Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia FM_USP.

**FACULDADE DE MEDICINA**
**DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na 174ª reunião no dia 31 de Agosto de 2010, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado: "**DENSIDADE MAMÁRIA E POLIMORFISMO DO RECEPTOR ESTROGÊNICO EM MULHERES NA PÓS MENOPAUSA COM MAMAS DENSAS",** dos seguintes pesquisadores: Marilene Alicia Souza, Angela Maggio da Fonseca e Edmund Chada Baracat, devendo ser encaminhado ao presidente da Comissão de Ética CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 01 de Setembro de 2010.

**Profa. Dra. ANGELA MAGGIO DA FONSECA**
Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

**Prof. Dr. SEIZO MIYADAHIRA**
Secretário do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

**APROVADO PELO CONSELHO**
**DO DOG EM 08 /09 /2010**

**PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT**
Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Anexo C -** Características clínicas das pacientes estudadas.

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m$^2$ | Idade ao Nascimento 1° Filho | Menarca | Fumo | Alcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 52 | Branca | 51 | 29 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 53 | Branca | 40 | 35 | 20 | 13 | 1 | 1 | 0 | 4 |
| 3 | 53 | Branca | 46 | 31 | 17 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 4 | 50 | Branca | 45 | 35 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 63 | Branca | 51 | 21 | 35 | 18 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 6 | 63 | Amarela | 52 | 25 | 30 | 14 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 7 | 56 | Amarela | 48 | 26 | 28 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 8 | 59 | Negra | 45 | 30 | 20 | 14 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 9 | 55 | Branca | 54 | 27 | 23 | 15 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 10 | 58 | Branca | 46 | 25 | 23 | 14 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 11 | 55 | Branca | 53 | 48 | 25 | 15 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | 61 | Parda | 55 | 35 | 25 | 9 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 13 | 58 | Branca | 50 | 32 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 62 | Branca | 50 | 30 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 50 | Branca | 44 | 35 | 34 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 16 | 60 | Parda | 45 | 24 | 30 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 17 | 59 | Negra | 37 | 35 | 25 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 18 | 59 | Parda | 51 | 20 | 20 | 15 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 19 | 64 | Branca | 51 | 29 | 39 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 20 | 59 | Branca | 44 | 21 | 24 | 15 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 21 | 54 | Branca | 40 | 32 | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 56 | Branca | 40 | 27 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 58 | Branca | 40 | 22 | 28 | 15 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 24 | 52 | Branca | 33 | 31 | 20 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 25 | 60 | Negra | 48 | 30 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 51 | Negra | 48 | 31 | 25 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 27 | 60 | Branca | 54 | 24 | 32 | 11 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 28 | 62 | Branca | 50 | 28 | 22 | 14 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 29 | 61 | Branca | 54 | 27 | 30 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 30 | 65 | Parda | 39 | 32 | 19 | 12 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 31 | 58 | Branca | 30 | 21 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 62 | Branca | 44 | 33 | 35 | 14 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 33 | 58 | Branca | 52 | 27 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 58 | Branca | 52 | 25 | 29 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 35 | 52 | Branca | 40 | 26 | 21 | 15 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 36 | 56 | Branca | 55 | 21 | 25 | 14 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 37 | 45 | Branca | 44 | 24 | 20 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 38 | 55 | Branca | 36 | 25 | 15 | 14 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 39 | 65 | Branca | 45 | 19 | 20 | 14 | 0 | 0 | 0 | 4 |

Continua.....

.....Continuação Anexo C

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m$^2$ | Idade ao Nascimento 1º Filho | Menarca | Fumo | Àlcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40 | 60 | Branca | 32 | 26 | 18 | 10 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 41 | 63 | Amarela | 50 | 28 | 33 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 42 | 62 | Parda | 40 | 23 | 40 | 14 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 43 | 57 | Branca | 48 | 30 | 30 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 44 | 63 | Branca | 39 | 30 | 20 | 15 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 45 | 60 | Branca | 45 | 23 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 46 | 65 | Branca | 49 | 30 | 22 | 12 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 47 | 65 | Branca | 53 | 25 | 25 | 10 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 48 | 64 | Parda | 53 | 30 | 20 | 10 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 49 | 63 | Negra | 52 | 30 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 61 | Branca | 30 | 22 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51 | 49 | Branca | 35 | 24 | 20 | 16 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 52 | 56 | Parda | 52 | 30 | 19 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 53 | 61 | Branca | 48 | 28 | 40 | 14 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 54 | 51 | Branca | 38 | 27 | 22 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 55 | 57 | Branca | 31 | 31 | 18 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 56 | 57 | Branca | 45 | 25 | 25 | 15 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 57 | 50 | Parda | 48 | 24 | 21 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 58 | 51 | Branca | 50 | 28 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 59 | 58 | Negra | 50 | 27 | 39 | 15 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 60 | 59 | Amarela | 42 | 21 | 26 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 61 | 64 | Parda | 50 | 35 | 25 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 62 | 56 | Parda | 51 | 22 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 63 | 55 | Branca | 50 | 24 | 20 | 12 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 64 | 52 | Branca | 48 | 24 | 26 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 65 | 65 | Branca | 50 | 22 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 66 | 48 | Branca | 47 | 27 | 25 | 10 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 67 | 55 | Parda | 50 | 22 | 45 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 68 | 62 | Parda | 43 | 27 | 36 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 69 | 46 | Parda | 45 | 36 | 25 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 70 | 60 | Branca | 53 | 33 | 17 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 71 | 52 | Parda | 50 | 34 | 22 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 72 | 56 | Branca | 55 | 27 | 18 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 73 | 45 | Parda | 43 | 30 | 23 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 74 | 58 | Negra | 49 | 31 | 23 | 12 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 75 | 48 | Branca | 47 | 22 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 76 | 62 | Branca | 48 | 24 | 40 | 13 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 77 | 59 | Branca | 50 | 37 | 24 | 12 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 78 | 50 | Negra | 36 | 21 | 22 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 79 | 55 | Negra | 36 | 31 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Continua.....

.....Continuação Anexo C

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m² | Idade ao Nascimento 1º Filho | Menarca | Fumo | Àlcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 80 | 61 | Branca | 36 | 19 | 28 | 15 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 81 | 60 | Negra | 53 | 22 | 31 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 82 | 59 | Branca | 50 | 20 | 33 | 12 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 83 | 59 | Parda | 45 | 34 | 22 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 84 | 64 | Branca | 33 | 16 | 21 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 85 | 64 | Parda | 51 | 22 | 27 | 16 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 86 | 55 | Parda | 47 | 32 | 19 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 87 | 58 | Negra | 56 | 30 | 0 | 19 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 88 | 64 | Amarela | 56 | 21 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 89 | 47 | Parda | 44 | 33 | 19 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 90 | 56 | Negra | 47 | 24 | 23 | 13 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 91 | 52 | Branca | 50 | 30 | 21 | 14 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 92 | 60 | Parda | 50 | 30 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 93 | 54 | Branca | 50 | 31 | 24 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 94 | 64 | Branca | 40 | 28 | 26 | 14 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 95 | 54 | Parda | 53 | 30 | 26 | 13 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 96 | 56 | Branca | 45 | 27 | 19 | 11 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 97 | 55 | Parda | 54 | 25 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 98 | 64 | Branca | 50 | 30 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 99 | 56 | Negra | 52 | 31 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 60 | Negra | 50 | 28 | 20 | 11 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 101 | 52 | Branca | 45 | 28 | 23 | 15 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 102 | 60 | Parda | 45 | 23 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 103 | 52 | Branca | 48 | 50 | 26 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 104 | 45 | Branca | 43 | 18 | 21 | 15 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| 105 | 54 | Parda | 42 | 30 | 17 | 14 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 106 | 50 | Parda | 43 | 26 | 0 | 12 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 107 | 59 | Parda | 46 | 27 | 25 | 17 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 108 | 47 | Parda | 40 | 24 | 21 | 13 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 109 | 53 | Negra | 50 | 30 | 18 | 11 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 110 | 51 | Amarela | 50 | 26 | 27 | 12 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| 111 | 55 | Branca | 52 | 21 | 16 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 112 | 58 | Branca | 43 | 27 | 22 | 12 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 113 | 50 | Branca | 43 | 21 | 18 | 13 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 114 | 52 | Parda | 50 | 21 | 18 | 13 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 115 | 54 | Parda | 52 | 38 | 17 | 13 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 116 | 55 | Branca | 54 | 31 | 18 | 13 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 117 | 61 | Branca | 54 | 20 | 38 | 13 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 118 | 54 | Branca | 44 | 33 | 21 | 14 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 119 | 58 | Amarela | 54 | 32 | 19 | 11 | 0 | 0 | 1 | 2 |

Continua.....

.....Continuação Anexo C

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m² | Idade ao Nascimento 1º Filho | Menarca | Fumo | Àlcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 120 | 53 | Negra | 49 | 27 | 23 | 12 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 121 | 55 | Parda | 49 | 27 | 0 | 13 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 122 | 45 | Parda | 30 | 18 | 22 | 19 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 123 | 62 | Branca | 27 | 21 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 124 | 63 | Branca | 49 | 26 | 22 | 14 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 125 | 50 | Parda | 42 | 25 | 18 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 126 | 62 | Branca | 48 | 26 | 19 | 14 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 127 | 54 | Negra | 42 | 23 | 30 | 14 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 128 | 56 | Branca | 38 | 23 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 129 | 62 | Parda | 54 | 26 | 24 | 11 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| 130 | 63 | Branca | 54 | 33 | 21 | 13 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 131 | 51 | Negra | 50 | 30 | 0 | 13 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 132 | 56 | Negra | 51 | 24 | 21 | 15 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 133 | 63 | Negra | 47 | 19 | 27 | 16 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 134 | 57 | Parda | 45 | 30 | 30 | 12 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 135 | 59 | Branca | 45 | 30 | 0 | 13 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 136 | 51 | Parda | 50 | 33 | 26 | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 137 | 48 | Branca | 46 | 26 | 17 | 16 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 138 | 63 | Branca | 49 | 26 | 22 | 14 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 139 | 64 | Parda | 46 | 37 | 20 | 16 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 140 | 53 | Parda | 46 | 26 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 141 | 65 | Branca | 55 | 22 | 0 | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 142 | 48 | Branca | 47 | 21 | 38 | 12 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 143 | 59 | Parda | 50 | 32 | 19 | 11 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 144 | 53 | Parda | 52 | 23 | 20 | 13 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 145 | 52 | Branca | 51 | 27 | 21 | 14 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 146 | 52 | Branca | 49 | 17 | 30 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 147 | 60 | Parda | 37 | 22 | 18 | 15 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 148 | 51 | Parda | 49 | 30 | 17 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 149 | 47 | Branca | 46 | 24 | 19 | 13 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 150 | 55 | Parda | 52 | 41 | 22 | 12 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 151 | 49 | Negra | 48 | 26 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 152 | 56 | Branca | 52 | 26 | 20 | 12 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 153 | 53 | Branca | 49 | 24 | 25 | 14 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 154 | 57 | Amarela | 50 | 19 | 40 | 11 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 155 | 46 | Branca | 43 | 21 | 18 | 11 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 156 | 54 | Negra | 42 | 32 | 20 | 12 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 157 | 62 | Branca | 48 | 33 | 20 | 11 | 1 | 1 | 0 | 4 |
| 158 | 48 | Negra | 40 | 24 | 18 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 159 | 53 | Branca | 40 | 28 | 17 | 14 | 1 | 0 | 1 | 3 |

Continua.....

.....Continuação Anexo C

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m$^2$ | Idade ao Nascimento 1º Filho | Menarca | Fumo | Àlcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 160 | 52 | Branca | 38 | 30 | 28 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 161 | 61 | Branca | 47 | 34 | 24 | 11 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 162 | 60 | Branca | 50 | 26 | 35 | 15 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 163 | 49 | Branca | 47 | 27 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 164 | 62 | Branca | 50 | 25 | 17 | 12 | 0 | 1 | 0 | 5 |
| 165 | 63 | Branca | 54 | 30 | 25 | 12 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 166 | 64 | Negra | 55 | 25 | 0 | 13 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 167 | 55 | Negra | 43 | 25 | 0 | 12 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 168 | 57 | Branca | 39 | 26 | 24 | 12 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 169 | 55 | Branca | 54 | 23 | 18 | 11 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 170 | 63 | Branca | 50 | 28 | 19 | 15 | 0 | 1 | 0 | 7 |
| 171 | 64 | Branca | 55 | 43 | 36 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 172 | 53 | Branca | 33 | 30 | 23 | 15 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 173 | 58 | Branca | 48 | 25 | 20 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 174 | 55 | Branca | 48 | 30 | 0 | 14 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 175 | 53 | Branca | 47 | 21 | 19 | 11 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 176 | 49 | Parda | 44 | 22 | 24 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 177 | 47 | Parda | 44 | 30 | 18 | 11 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 178 | 50 | Parda | 43 | 33 | 28 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 179 | 52 | Parda | 50 | 23 | 18 | 12 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 180 | 63 | Branca | 57 | 30 | 24 | 12 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 181 | 52 | Branca | 51 | 19 | 34 | 14 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 182 | 56 | Amarela | 53 | 21 | 36 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 183 | 64 | Branca | 45 | 30 | 25 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 184 | 64 | Branca | 49 | 23 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 185 | 47 | Branca | 46 | 19 | 21 | 17 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 186 | 56 | Branca | 53 | 27 | 19 | 16 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 187 | 56 | Branca | 49 | 37 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 188 | 61 | Parda | 47 | 30 | 27 | 16 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 189 | 52 | Branca | 33 | 25 | 18 | 12 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 190 | 58 | Amarela | 54 | 24 | 26 | 15 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 191 | 59 | Branca | 54 | 24 | 21 | 15 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 192 | 64 | Branca | 48 | 23 | 19 | 14 | 0 | 0 | 1 | 6 |
| 193 | 58 | Branca | 48 | 31 | 35 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 194 | 47 | Negra | 40 | 24 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 195 | 62 | Parda | 55 | 25 | 31 | 19 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 196 | 61 | Parda | 52 | 27 | 30 | 12 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 197 | 53 | Negra | 50 | 32 | 22 | 12 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 198 | 63 | Branca | 47 | 24 | 25 | 10 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 199 | 65 | Negra | 50 | 30 | 23 | 10 | 0 | 0 | 0 | 2 |

Continua.....

.....Continuação Anexo C

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m$^2$ | Idade ao Nascimento 1º Filho | Menarca | Fumo | Àlcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 200 | 53 | Branca | 30 | 22 | 28 | 15 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 201 | 56 | Parda | 48 | 27 | 26 | 13 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 202 | 50 | Negra | 35 | 23 | 0 | 15 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 203 | 50 | Negra | 34 | 21 | 29 | 16 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| 204 | 45 | Parda | 44 | 32 | 19 | 12 | 0 | 0 | 1 | 6 |
| 205 | 50 | Branca | 49 | 22 | 20 | 15 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 206 | 59 | Branca | 50 | 24 | 34 | 15 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 207 | 59 | Branca | 36 | 23 | 0 | 12 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 208 | 54 | Branca | 49 | 30 | 18 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 209 | 65 | Branca | 40 | 30 | 26 | 15 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 210 | 55 | Parda | 40 | 37 | 21 | 12 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 211 | 61 | Branca | 54 | 21 | 28 | 12 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 212 | 64 | Branca | 50 | 24 | 20 | 12 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 213 | 62 | Branca | 45 | 24 | 22 | 13 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 214 | 58 | Branca | 49 | 30 | 28 | 14 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 215 | 50 | Parda | 33 | 36 | 15 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 216 | 50 | Branca | 31 | 30 | 27 | 13 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 217 | 60 | Branca | 49 | 32 | 20 | 16 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 218 | 53 | Parda | 47 | 30 | 20 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 219 | 45 | Parda | 44 | 30 | 17 | 12 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| 220 | 54 | Parda | 35 | 30 | 16 | 13 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 221 | 50 | Branca | 50 | 22 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 222 | 50 | Amarela | 49 | 30 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 223 | 61 | Branca | 42 | 27 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 224 | 64 | Branca | 50 | 20 | 0 | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 225 | 58 | Branca | 41 | 33 | 19 | 13 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 226 | 51 | Parda | 49 | 23 | 21 | 17 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| 227 | 52 | Branca | 51 | 25 | 26 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 228 | 53 | Parda | 50 | 22 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 229 | 67 | Branca | 52 | 23 | 40 | 14 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 230 | 46 | Branca | 45 | 23 | 20 | 18 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| 231 | 63 | Parda | 56 | 35 | 26 | 12 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 232 | 62 | Negra | 40 | 18 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 233 | 45 | Negra | 44 | 25 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 234 | 53 | Amarela | 50 | 22 | 30 | 14 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 234 | 53 | Negra | 50 | 37 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 236 | 64 | Branca | 53 | 32 | 25 | 16 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 237 | 65 | Amarela | 25 | 32 | 0 | 12 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 238 | 63 | Branca | 30 | 25 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 239 | 53 | Branca | 50 | 40 | 31 | 14 | 0 | 0 | 0 | 2 |

Continua.....

.....Continuação Anexo C

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m$^2$ | Idade ao Nascimento 1º Filho | Menarca | Fumo | Àlcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 240 | 59 | Amarela | 46 | 37 | 23 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 241 | 47 | Branca | 35 | 23 | 0 | 16 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 242 | 44 | Branca | 43 | 21 | 19 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 243 | 58 | Branca | 48 | 27 | 32 | 13 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 244 | 48 | Branca | 47 | 22 | 23 | 17 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 245 | 56 | Branca | 50 | 31 | 0 | 13 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 246 | 64 | Parda | 42 | 24 | 24 | 11 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| 247 | 56 | Negra | 45 | 23 | 39 | 13 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 248 | 59 | Branca | 39 | 30 | 0 | 11 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 249 | 55 | Branca | 54 | 38 | 23 | 11 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 250 | 46 | Negra | 45 | 23 | 30 | 15 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 251 | 55 | Branca | 53 | 20 | 29 | 12 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 252 | 58 | Branca | 48 | 26 | 0 | 14 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 253 | 59 | Branca | 34 | 30 | 19 | 13 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 254 | 53 | Branca | 42 | 26 | 23 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 255 | 50 | Branca | 49 | 22 | 32 | 16 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 256 | 64 | Branca | 40 | 30 | 22 | 17 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 257 | 60 | Negra | 48 | 25 | 26 | 17 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 258 | 53 | Branca | 43 | 23 | 17 | 15 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 259 | 57 | Branca | 53 | 32 | 0 | 12 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 260 | 57 | Amarela | 55 | 23 | 29 | 14 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 261 | 51 | Parda | 35 | 30 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 262 | 61 | Branca | 51 | 26 | 42 | 11 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 263 | 57 | Branca | 46 | 26 | 22 | 14 | 1 | 0 | 1 | 6 |
| 264 | 59 | Negra | 55 | 26 | 19 | 12 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 265 | 47 | Branca | 39 | 20 | 19 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 266 | 59 | Branca | 52 | 30 | 27 | 12 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 267 | 45 | Branca | 42 | 21 | 26 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 268 | 62 | Negra | 48 | 30 | 29 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 269 | 65 | Branca | 40 | 26 | 20 | 16 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 270 | 65 | Branca | 48 | 18 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 271 | 54 | Branca | 48 | 30 | 22 | 15 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 272 | 54 | Branca | 49 | 22 | 22 | 12 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 273 | 63 | Parda | 59 | 30 | 23 | 11 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 274 | 54 | Branca | 49 | 24 | 26 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 275 | 58 | Branca | 50 | 30 | 26 | 12 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 276 | 58 | Branca | 48 | 23 | 26 | 13 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 277 | 59 | Branca | 50 | 28 | 26 | 13 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 278 | 61 | Negra | 43 | 23 | 27 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 279 | 55 | Branca | 53 | 28 | 18 | 11 | 0 | 0 | 0 | 4 |

Continua.....

.....Conclusão Anexo C

| Pacientes | Idade | Cor | DUM | IMC Kg/m$^2$ | Idade ao Nascimento 1º Filho | Menarca | Fumo | Àlcool | AF | nº de partos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 280 | 63 | Parda | 51 | 25 | 0 | 15 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 281 | 52 | Negra | 41 | 32 | 15 | 11 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 282 | 58 | Branca | 49 | 23 | 19 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 283 | 55 | Branca | 50 | 25 | 18 | 11 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 284 | 59 | Negra | 45 | 22 | 20 | 15 | 1 | 1 | 0 | 4 |
| 285 | 48 | Branca | 43 | 23 | 18 | 11 | 1 | 0 | 1 | 5 |
| 286 | 60 | Branca | 34 | 22 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 287 | 54 | Branca | 52 | 21 | 32 | 13 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 288 | 51 | Parda | 49 | 22 | 24 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 289 | 52 | Negra | 51 | 30 | 22 | 12 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 290 | 55 | Negra | 47 | 30 | 21 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 291 | 47 | Parda | 34 | 21 | 26 | 13 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 292 | 49 | Parda | 43 | 22 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 293 | 58 | Branca | 54 | 27 | 15 | 13 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 294 | 54 | Negra | 50 | 24 | 20 | 15 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 295 | 54 | Branca | 51 | 35 | 28 | 13 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 296 | 53 | Parda | 52 | 30 | 18 | 14 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 297 | 57 | Branca | 49 | 27 | 28 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 298 | 59 | Branca | 52 | 27 | 18 | 15 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 299 | 53 | Negra | 27 | 23 | 18 | 14 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 300 | 64 | Branca | 49 | 35 | 15 | 13 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| 301 | 60 | Branca | 51 | 22 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 302 | 56 | Branca | 54 | 23 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 303 | 65 | Branca | 53 | 31 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 304 | 56 | Branca | 39 | 27 | 16 | 11 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 305 | 59 | Branca | 45 | 28 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 306 | 62 | Negra | 40 | 23 | 0 | 13 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 307 | 57 | Branca | 51 | 23 | 0 | 13 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 308 | 49 | Branca | 48 | 19 | 29 | 11 | 0 | 0 | 0 | 1 |

0 = Ausente

1 = Presente

**Anexo D –** Avaliação subjetiva e avaliação objetiva da densidade mamográfica

| Número | AV SUBJ | AV OBJ | Número | AV SUBJ | AV OBJ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 40 | 1 | 1 |
| 2 | 0 | 1 | 41 | 1 | 1 |
| 3 | 1 | 1 | 42 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 43 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | 1 | 44 | 1 | 1 |
| 6 | 1 | 1 | 45 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | 46 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 47 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | 1 | 48 | 1 | 1 |
| 10 | 0 | 1 | 49 | 1 | 1 |
| 11 | 1 | 1 | 50 | 1 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | 51 | 1 | 1 |
| 13 | 1 | 1 | 52 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | 1 | 53 | 1 | 1 |
| 15 | 0 | 1 | 54 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 55 | 1 | 1 |
| 17 | 1 | 1 | 56 | 1 | 1 |
| 18 | 1 | 1 | 57 | 1 | 1 |
| 19 | 1 | 1 | 58 | 1 | 1 |
| 20 | 1 | 1 | 59 | 1 | 1 |
| 21 | 1 | 1 | 60 | 1 | 1 |
| 22 | 1 | 1 | 61 | 1 | 1 |
| 23 | 1 | 1 | 62 | 1 | 1 |
| 24 | 1 | 1 | 63 | 0 | 1 |
| 25 | 1 | 1 | 64 | 1 | 1 |
| 26 | 1 | 1 | 65 | 1 | 1 |
| 27 | 1 | 1 | 66 | 1 | 1 |
| 28 | 1 | 1 | 67 | 1 | 1 |
| 29 | 1 | 1 | 68 | 1 | 1 |
| 30 | 1 | 1 | 69 | 1 | 1 |
| 31 | 1 | 1 | 70 | 1 | 1 |
| 32 | 1 | 1 | 71 | 1 | 1 |
| 33 | 1 | 1 | 72 | 0 | 1 |
| 34 | 1 | 1 | 73 | 1 | 1 |
| 35 | 1 | 1 | 74 | 1 | 1 |
| 36 | 1 | 1 | 75 | 1 | 1 |
| 37 | 1 | 1 | 76 | 1 | 1 |
| 38 | 0 | 1 | 77 | 1 | 1 |
| 39 | 1 | 1 | 78 | 1 | 1 |

Continua.....

.....Continuação Anexo D

| Número | AV SUBJ | AV OBJ | Número | AV SUBJ | AV OBJ |
|---|---|---|---|---|---|
| 79 | 1 | 1 | 120 | 1 | 1 |
| 80 | 1 | 1 | 121 | 0 | 1 |
| 81 | 1 | 1 | 122 | 1 | 1 |
| 82 | 1 | 1 | 123 | 1 | 1 |
| 83 | 1 | 1 | 124 | 1 | 1 |
| 84 | 1 | 1 | 125 | 0 | 1 |
| 85 | 1 | 1 | 126 | 1 | 1 |
| 86 | 1 | 1 | 127 | 1 | 1 |
| 87 | 1 | 1 | 128 | 1 | 1 |
| 88 | 0 | 1 | 129 | 1 | 1 |
| 89 | 1 | 1 | 130 | 1 | 1 |
| 90 | 1 | 1 | 131 | 1 | 1 |
| 91 | 1 | 1 | 132 | 1 | 1 |
| 92 | 1 | 1 | 133 | 1 | 1 |
| 93 | 1 | 1 | 134 | 1 | 1 |
| 94 | 0 | 1 | 135 | 1 | 1 |
| 95 | 1 | 1 | 136 | 1 | 1 |
| 96 | 1 | 1 | 137 | 0 | 1 |
| 97 | 1 | 1 | 138 | 1 | 1 |
| 98 | 1 | 1 | 139 | 0 | 1 |
| 99 | 1 | 1 | 140 | 1 | 1 |
| 100 | 0 | 1 | 141 | 0 | 1 |
| 101 | 1 | 1 | 142 | 1 | 1 |
| 102 | 1 | 1 | 143 | 0 | 1 |
| 103 | 1 | 1 | 144 | 1 | 1 |
| 104 | 1 | 1 | 145 | 1 | 1 |
| 105 | 1 | 1 | 146 | 1 | 1 |
| 106 | 1 | 1 | 147 | 0 | 1 |
| 107 | 1 | 1 | 148 | 1 | 1 |
| 108 | 1 | 1 | 149 | 0 | 1 |
| 109 | 1 | 1 | 150 | 1 | 1 |
| 110 | 1 | 1 | 151 | 1 | 1 |
| 111 | 1 | 1 | 152 | 1 | 1 |
| 112 | 1 | 1 | 153 | 0 | 1 |
| 113 | 0 | 1 | 154 | 1 | 1 |
| 114 | 1 | 1 | 155 | 1 | 1 |
| 115 | 0 | 1 | 156 | 1 | 1 |
| 116 | 1 | 1 | 157 | 1 | 1 |
| 117 | 1 | 1 | 158 | 1 | 1 |
| 118 | 1 | 1 | 159 | 0 | 1 |
| 119 | 0 | 1 | 160 | 1 | 1 |

Continua.....

.....Continuação Anexo D

| Número | AV SUBJ | AV OBJ | Número | AV SUBJ | AV OBJ |
|---|---|---|---|---|---|
| 161 | 1 | 1 | 202 | 1 | 1 |
| 162 | 0 | 1 | 203 | 1 | 1 |
| 163 | 1 | 1 | 204 | 1 | 1 |
| 164 | 0 | 1 | 205 | 1 | 1 |
| 165 | 1 | 1 | 206 | 1 | 1 |
| 166 | 0 | 1 | 207 | 1 | 1 |
| 167 | 1 | 1 | 208 | 1 | 1 |
| 168 | 0 | 1 | 209 | 1 | 1 |
| 169 | 1 | 1 | 210 | 1 | 1 |
| 170 | 1 | 1 | 211 | 1 | 1 |
| 171 | 1 | 1 | 212 | 1 | 1 |
| 172 | 1 | 1 | 213 | 1 | 1 |
| 173 | 0 | 1 | 214 | 1 | 1 |
| 174 | 1 | 1 | 215 | 1 | 1 |
| 175 | 1 | 1 | 216 | 1 | 1 |
| 176 | 1 | 1 | 217 | 1 | 1 |
| 177 | 1 | 1 | 218 | 1 | 1 |
| 178 | 1 | 1 | 219 | 1 | 1 |
| 179 | 1 | 1 | 220 | 1 | 1 |
| 180 | 1 | 1 | 221 | 1 | 1 |
| 181 | 1 | 1 | 222 | 1 | 1 |
| 182 | 1 | 1 | 223 | 1 | 1 |
| 183 | 1 | 1 | 224 | 1 | 1 |
| 184 | 1 | 1 | 225 | 1 | 1 |
| 185 | 1 | 1 | 226 | 1 | 1 |
| 186 | 1 | 1 | 227 | 1 | 1 |
| 187 | 1 | 1 | 228 | 1 | 1 |
| 188 | 1 | 1 | 229 | 1 | 1 |
| 189 | 1 | 1 | 230 | 1 | 1 |
| 190 | 1 | 1 | 231 | 1 | 1 |
| 191 | 1 | 1 | 232 | 1 | 1 |
| 192 | 1 | 1 | 233 | 1 | 1 |
| 193 | 1 | 1 | 234 | 1 | 1 |
| 194 | 1 | 1 | 234 | 1 | 1 |
| 195 | 1 | 1 | 236 | 1 | 1 |
| 196 | 1 | 1 | 237 | 1 | 1 |
| 197 | 1 | 1 | 238 | 1 | 1 |
| 198 | 1 | 1 | 239 | 1 | 1 |
| 199 | 1 | 1 | 240 | 1 | 1 |
| 200 | 1 | 1 | 241 | 1 | 1 |
| 201 | 1 | 1 | 242 | 1 | 1 |

Continua.....

.....Continuação Anexo D

| Número | AV SUBJ | AV OBJ | Número | AV SUBJ | AV OBJ |
|---|---|---|---|---|---|
| 243 | 1 | 1 | 276 | 1 | 1 |
| 244 | 1 | 1 | 277 | 1 | 1 |
| 245 | 1 | 1 | 278 | 1 | 1 |
| 246 | 1 | 1 | 279 | 1 | 1 |
| 247 | 1 | 1 | 280 | 1 | 1 |
| 248 | 1 | 1 | 281 | 1 | 1 |
| 249 | 1 | 1 | 282 | 1 | 1 |
| 250 | 1 | 1 | 283 | 1 | 1 |
| 251 | 1 | 1 | 284 | 1 | 1 |
| 252 | 1 | 1 | 285 | 1 | 1 |
| 253 | 1 | 1 | 286 | 1 | 1 |
| 254 | 1 | 1 | 287 | 1 | 1 |
| 255 | 1 | 1 | 288 | 1 | 1 |
| 256 | 1 | 1 | 289 | 1 | 1 |
| 257 | 1 | 1 | 290 | 1 | 1 |
| 258 | 1 | 1 | 291 | 1 | 1 |
| 259 | 1 | 1 | 292 | 1 | 1 |
| 260 | 1 | 1 | 293 | 1 | 1 |
| 261 | 1 | 1 | 294 | 1 | 1 |
| 262 | 1 | 1 | 295 | 1 | 1 |
| 263 | 1 | 1 | 296 | 1 | 1 |
| 264 | 1 | 1 | 297 | 1 | 1 |
| 265 | 1 | 1 | 298 | 1 | 1 |
| 266 | 1 | 1 | 299 | 1 | 1 |
| 267 | 1 | 1 | 300 | 1 | 1 |
| 268 | 1 | 1 | 301 | 1 | 1 |
| 269 | 1 | 1 | 302 | 1 | 1 |
| 270 | 1 | 1 | 303 | 1 | 1 |
| 271 | 1 | 1 | 304 | 1 | 1 |
| 272 | 1 | 1 | 305 | 1 | 1 |
| 273 | 1 | 1 | 306 | 1 | 1 |
| 274 | 1 | 1 | 307 | 1 | 1 |
| 275 | 1 | 1 | 308 | 1 | 1 |

**0 = NÃO DENSA**
**1 = DENSA**

## Anexo E – Distribuição dos polimorfismos *Pvull, Xbal (GT)n*

| Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* | Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Pp | Xx | 16 | 40 | pp | xx | 15 |
| 2 | pp | xx | 15 | 41 | PP | Xx | 13 |
| 3 | Pp | xx | 20 | 42 | pp | xx | 16 |
| 4 | pp | xx | 16 | 43 | Pp | xx | 16 |
| 5 | PP | XX | 16 | 44 | PP | XX | 17 |
| 6 | PP | XX | 16 | 45 | Pp | Xx | 15 |
| 7 | pp | Xx | 15 | 46 | pp | xx | 15 |
| 8 | Pp | Xx | 15 | 47 | PP | XX | 16 |
| 9 | Pp | Xx | 14 | 48 | Pp | Xx | 16 |
| 10 | Pp | Xx | 17 | 49 | Pp | xx | 17 |
| 11 | Pp | xx | 16 | 50 | pp | xx | 15 |
| 12 | Pp | xx | 14 | 51 | Pp | xx | 15 |
| 13 | Pp | Xx | 16 | 52 | PP | XX | 16 |
| 14 | Pp | xx | 16 | 53 | Pp | Xx | 16 |
| 15 | Pp | Xx | 14 | 54 | pp | xx | 16 |
| 16 | PP | Xx | 15 | 55 | Pp | Xx | 16 |
| 17 | pp | Xx | 17 | 56 | pp | Xx | 14 |
| 18 | pp | xx | 16 | 57 | PP | Xx | 16 |
| 19 | Pp | Xx | 15 | 58 | pp | xx | 16 |
| 20 | pp | xx | 15 | 59 | Pp | Xx | 15 |
| 21 | Pp | Xx | 15 | 60 | Pp | Xx | 16 |
| 22 | pp | xx | 16 | 61 | pp | xx | 15 |
| 23 | PP | XX | 14 | 62 | pp | xx | 19 |
| 24 | pp | Xx | 15 | 63 | pp | Xx | 18 |
| 25 | pp | Xx | 16 | 64 | Pp | Xx | 17 |
| 26 | PP | XX | 15 | 65 | Pp | Xx | 16 |
| 27 | Pp | xx | 17 | 66 | pp | xx | 14 |
| 28 | Pp | Xx | 16 | 67 | pp | xx | 16 |
| 29 | Pp | Xx | 16 | 68 | pp | Xx | 16 |
| 30 | Pp | xx | 15 | 69 | Pp | xx | 16 |
| 31 | Pp | xx | 16 | 70 | Pp | Xx | 16 |
| 32 | Pp | xx | 15 | 71 | PP | XX | 15 |
| 33 | Pp | Xx | 17 | 72 | Pp | xx | 16 |
| 34 | pp | xx | 18 | 73 | Pp | Xx | 15 |
| 35 | Pp | xx | 16 | 74 | PP | Xx | 16 |
| 36 | pp | Xx | 14 | 75 | PP | XX | 16 |
| 37 | Pp | Xx | 16 | 76 | PP | XX | 16 |
| 38 | PP | XX | 19 | 77 | PP | XX | 16 |
| 39 | pp | xx | 17 | 78 | pp | Xx | 16 |

Continua.....

.....Continuação Anexo D

| Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* | Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 79 | pp | Xx | 14 | 120 | pp | Xx | 15 |
| 80 | pp | xx | 15 | 121 | PP | XX | 15 |
| 81 | pp | Xx | 15 | 122 | Pp | Xx | 15 |
| 82 | Pp | Xx | 15 | 123 | Pp | Xx | 16 |
| 83 | pp | Xx | 14 | 124 | Pp | Xx | 17 |
| 84 | Pp | Xx | 16 | 125 | PP | XX | 16 |
| 85 | Pp | Xx | 15 | 126 | pp | xx | 15 |
| 86 | Pp | xx | 15 | 127 | pp | xx | 16 |
| 87 | pp | xx | 19 | 128 | Pp | Xx | 22 |
| 88 | pp | Xx | 16 | 129 | PP | XX | 15 |
| 89 | Pp | Xx | 15 | 130 | Pp | xx | 14 |
| 90 | pp | Xx | 16 | 131 | Pp | xx | 16 |
| 91 | pp | xx | 12 | 132 | Pp | XX | 15 |
| 92 | pp | xx | 15 | 133 | Pp | Xx | 14 |
| 93 | PP | XX | 15 | 134 | pp | xx | 18 |
| 94 | Pp | xx | 17 | 135 | pp | xx | 14 |
| 95 | Pp | Xx | 15 | 136 | PP | XX | 16 |
| 96 | pp | xx | 17 | 137 | PP | XX | 16 |
| 97 | Pp | Xx | 18 | 138 | pp | xx | 16 |
| 98 | pp | xx | 16 | 139 | pp | xx | 16 |
| 99 | Pp | xx | 16 | 140 | PP | Xx | 14 |
| 100 | Pp | xx | 15 | 141 | PP | XX | 14 |
| 101 | Pp | Xx | 14 | 142 | Pp | Xx | 15 |
| 102 | pp | xx | 16 | 143 | Pp | Xx | 16 |
| 103 | Pp | Xx | 16 | 144 | pp | Xx | 15 |
| 104 | pp | xx | 16 | 145 | PP | XX | 15 |
| 105 | PP | XX | 18 | 146 | PP | XX | 14 |
| 106 | Pp | Xx | 15 | 147 | PP | XX | 14 |
| 107 | Pp | Xx | 14 | 148 | PP | Xx | 17 |
| 108 | Pp | Xx | 15 | 149 | pp | xx | 15 |
| 109 | Pp | Xx | 14 | 150 | PP | XX | 16 |
| 110 | pp | xx | 14 | 151 | Pp | XX | 15 |
| 111 | Pp | Xx | 14 | 152 | Pp | Xx | 15 |
| 112 | Pp | Xx | 16 | 153 | pp | xx | 14 |
| 113 | pp | Xx | 16 | 154 | pp | Xx | 14 |
| 114 | pp | xx | 15 | 155 | Pp | Xx | 18 |
| 115 | Pp | xx | 16 | 156 | Pp | Xx | 14 |
| 116 | pp | xx | 19 | 157 | PP | XX | 14 |
| 117 | pp | xx | 16 | 158 | Pp | Xx | 14 |
| 118 | pp | Xx | 16 | 159 | Pp | Xx | 16 |
| 119 | Pp | Xx | 14 | 160 | Pp | Xx | 17 |

Continua.....

.....Continuação Anexo D

| Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* | Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 161 | Pp | xx | 16 | 202 | pp | Xx | 14 |
| 162 | pp | xx | 15 | 203 | pp | Xx | 17 |
| 163 | PP | xx | 15 | 204 | Pp | Xx | 12 |
| 164 | pp | xx | 16 | 205 | Pp | Xx | 16 |
| 165 | Pp | Xx | 17 | 206 | pp | xx | 16 |
| 166 | pp | xx | 16 | 207 | Pp | Xx | 16 |
| 167 | Pp | Xx | 16 | 208 | PP | XX | 16 |
| 168 | pp | Xx | 16 | 209 | Pp | xX | 17 |
| 169 | PP | Xx | 12 | 210 | PP | XX | 16 |
| 170 | Pp | xx | 16 | 211 | Pp | xx | 16 |
| 171 | Pp | Xx | 16 | 212 | Pp | Xx | 15 |
| 172 | pp | xx | 15 | 213 | Pp | Xx | 15 |
| 173 | Pp | Xx | 14 | 214 | Pp | Xx | 16 |
| 174 | pp | xx | 15 | 215 | PP | XX | 16 |
| 175 | Pp | Xx | 16 | 216 | PP | XX | 17 |
| 176 | Pp | xx | 15 | 217 | pp | Xx | 16 |
| 177 | pp | xx | 15 | 218 | PP | xx | 21 |
| 178 | pp | xx | 15 | 219 | pp | xx | 12 |
| 179 | pp | xx | 16 | 220 | pp | Xx | 16 |
| 180 | PP | XX | 14 | 221 | Pp | Xx | 16 |
| 181 | pp | Xx | 16 | 222 | pp | xx | 17 |
| 182 | pp | xx | 16 | 223 | pp | xx | 16 |
| 183 | Pp | Xx | 16 | 224 | Pp | Xx | 22 |
| 184 | Pp | Xx | 15 | 225 | Pp | Xx | 14 |
| 185 | pp | Xx | 15 | 226 | Pp | Xx | 16 |
| 186 | Pp | Xx | 15 | 227 | Pp | xx | 17 |
| 187 | Pp | Xx | 20 | 228 | pp | Xx | 15 |
| 188 | PP | XX | 15 | 229 | PP | XX | 16 |
| 189 | Pp | xx | 12 | 230 | pp | Xx | 16 |
| 190 | pp | Xx | 15 | 231 | PP | Xx | 16 |
| 191 | Pp | XX | 14 | 232 | PP | XX | 11 |
| 192 | Pp | xx | 17 | 233 | Pp | Xx | 16 |
| 193 | Pp | Xx | 12 | 234 | PP | XX | 19 |
| 194 | PP | XX | 12 | 234 | Pp | Xx | 15 |
| 195 | pp | Xx | 15 | 236 | pp | Xx | 18 |
| 196 | pp | xx | 15 | 237 | Pp | Xx | 17 |
| 197 | Pp | Xx | 15 | 238 | PP | XX | 16 |
| 198 | Pp | Xx | 12 | 239 | PP | XX | 16 |
| 199 | Pp | Xx | 15 | 240 | Pp | xx | 19 |
| 200 | Pp | Xx | 16 | 241 | pp | xx | 14 |
| 201 | Pp | Xx | 12 | 242 | pp | xx | 15 |

Continua.....

.....Continuação Anexo D

| Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* | Número | *Pvull* | *Xba l* | *(GT) n* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 243 | Pp | Xx | 15 | 276 | Pp | Xx | 18 |
| 244 | PP | XX | 15 | 277 | Pp | Xx | 16 |
| 245 | pp | Xx | 17 | 278 | pp | Xx | 15 |
| 246 | pp | Xx | 15 | 279 | PP | XX | 11 |
| 247 | Pp | Xx | 18 | 280 | Pp | Xx | 15 |
| 248 | Pp | Xx | 16 | 281 | Pp | XX | 16 |
| 249 | Pp | Xx | 11 | 282 | Pp | XX | 11 |
| 250 | pp | Xx | 16 | 283 | Pp | Xx | 15 |
| 251 | pp | xx | 18 | 284 | PP | xx | 19 |
| 252 | PP | XX | 15 | 285 | Pp | Xx | 15 |
| 253 | Pp | Xx | 16 | 286 | Pp | XX | 22 |
| 254 | PP | XX | 16 | 287 | Pp | Xx | 13 |
| 255 | pp | Xx | 16 | 288 | Pp | xx | 17 |
| 256 | Pp | xx | 16 | 289 | Pp | xx | 14 |
| 257 | PP | Xx | 11 | 290 | Pp | Xx | 16 |
| 258 | PP | XX | 18 | 291 | Pp | xx | 16 |
| 259 | pp | xx | 17 | 292 | Pp | xx | 19 |
| 260 | Pp | xx | 18 | 293 | Pp | Xx | 14 |
| 261 | Pp | Xx | 14 | 294 | Pp | Xx | 16 |
| 262 | Pp | Xx | 16 | 295 | pp | xx | 15 |
| 263 | PP | XX | 16 | 296 | Pp | Xx | 15 |
| 264 | pp | xx | 18 | 297 | PP | xx | 15 |
| 265 | pp | Xx | 15 | 298 | PP | XX | 16 |
| 266 | Pp | Xx | 16 | 299 | Pp | Xx | 16 |
| 267 | pp | Xx | 16 | 300 | Pp | Xx | 18 |
| 268 | PP | Xx | 17 | 301 | PP | Xx | 16 |
| 269 | PP | Xx | 16 | 302 | PP | XX | 16 |
| 270 | Pp | Xx | 18 | 303 | pp | xx | 16 |
| 271 | Pp | xx | 16 | 304 | Pp | Xx | 12 |
| 272 | pp | xx | 17 | 305 | Pp | xx | 13 |
| 273 | pp | xx | 14 | 306 | Pp | Xx | 15 |
| 274 | pp | xx | 16 | 307 | Pp | Xx | 16 |
| 275 | Pp | Xx | 15 | 308 | pp | xx | 16 |

# 9 REFERÊNCIAS


ACR BI-RADS®. American College of Radiology. Breast Imaging Reporting and Data System. Fourth ed. Reston VA; 2003.

American Cancer Society - ACS. [cited 2012 jan. 6]. Available from: http://www.cancer.org/.

Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Borresen AL. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet.* 1994;94:665-70.

Baracat EC, Kemp C. Fisiologia mamária. In: Pasqualette HA, Koch HA, Soares-Pereira PM. Mamografia Atual. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p.31-8.

Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell.* 1991;64(2):235-48.

Blane CE, Fitzgerald JT, Gruppen LD, Helvie MA, Andersson I. Decreasing rate of fatty involution at screening mammography. *Acad Radiol.* 2002;9:895-8.

Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Smith JR, Wen W, Gao YT and Zheng W. Polymorphisms in ERα gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1093-8.

Boyd NF, Martin LJ, Bronskill M, Yaffe MJ, Duric N, Minkin S. Breats tissue composition and susceptibility to breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:1224-37.

Boyd NF, Greenberg C, Lockwood G, Little L, Martin L, Byng J, Yaffe M, Tritchler D. Effects at two years of a low-fat, high-carbohydrate diet on radiologic features of the breast: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(7):488-96.

Brandi ML, Becherini L, Gennari L, Racchi M, Bianchetti A, Nacmias B, Sorbi S, Mecocci P, Senin U, Govoni S. Association of the estrogen receptor α gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochemical Biophysical Res Communications.*1999; 265(2): 335-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. [citado 23 mar. 2012]. Disponível em: http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205

Buttler LM, Gold EB, Greendale GA, Crandall CJ, Modugno F, Oestreicher N, Quesenberry Jr CP, Habel LA. Menstrual and reproductive factors in relation to mammographic density: the study of women's health across the nation (SWAN). *J Natl Cancer Inst.* 2008;112(1):165-74.

Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N , Salane M, Brinton LA. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age and menopause status. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1622-9.

Cai Q, Gao YT, Wen W, Shu XO, Jin F, Smith JR and Zheng W. Association of breast cancer risk with a *GT* dinucleotide repeat polymorphism upstream of the estrogen receptor-α gene. *Cancer Res*. 2003A;63:5727-30.

Cai Q, Shu XO, Jin F, Daí Q, Wen W, Cheng JR, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor α gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003B;12(9):853-9.

Crandall CJ, Sehl ME, Crawford SL, Gold EB, Habel LA, Butler LM, Sowers MR, Grendale GA, Sinsheimer JS. Sex steroid metabolism polymorphisms and mammographic density in pre – and early perimenopausal women. *Breast Cancer Res.* 2009;11:1-15.

Curran JE, Lea RA, Rutherford S, Weinstein SR, Griffiths LR. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer*. 2001;95:271-5.

Del Senno L, Aguiari GL, Piva R. Dinucleotide repeat polymorphism in the human estrogen receptor (ESR) gene. *Hum Mol Genet.* 1992;1(5):354.

Ding SL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Hsu HM, Ho JY, Lin YH, Chang CC, Fann CSJ, Cheng CW, Wu PE, Shen CY. Diverse associations between ESR1 polymorphism and breast cancer development and progression. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3473-84

Dumas I, Diorio C. Polymorphisms in genes involved in the estrogen pathway and mammographic density. *BMC Cancer.* 2010;10:636-45.

Dumas I, Diorio C. Estrogen pathway polymorphisms and mammographic density. *Anticancer Res.* 2011;31:4369-86.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, Teare MD, Ponder BAJ and Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1999;8:843-54.

Dunning AM, Healey CS, Baynes C, Maia AT, Scollen S, Vega A, Rodrigues R, Barbosa-Morais NL. Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2009;18:1131-9.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PDP, Thompson D, Ballinger DG, Jeffery P. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nat Med.* 2007;447:1087-93.

Ellisson RC, Zhang Y, McLennan CE, Rothman KJ. Exploring the relation of alcohol consumption to risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.* 2001;154(8):740-7.

Flint-Garcia SA,Thornsberry JM, Buckler ES. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol* Palo Alto. 2003;54:357-74.

Garcia-Closas M, Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor (ER) status. *Clin Cancer Res.* 2008;14:8000-9.

Gennari L, Merlotti D, Paola VD, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2004;161(4):307-20.

Giacomazzi J. *Fatores de risco para o câncer de mama e polimorfismos nos genes ER, PR e STK15 em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre*. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

Ghafoor A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Thun M. Trends in breast cancer by race and ethnicity. *CA Cancer J Clin.* 2003;53(6):342-55.

González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, Pérez LI, González-Perez A, Morón FJ, Nogueira JAM, Real LM, Pascual MH, Ruiz A, Royo JL. Analysis of the ER alpha germline *Pvull* marker in breast cancer risk. *Med Sci Monit.* 2008;14:136-43.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Horty Y. Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986;231:1150-4.

Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of nuclear receptor superfamily. *Nature.* 2004;3:950-64.

Haiman CA, Hankinson SE, De Vivo I, Guillemette C, Ishibe N, Hunter DJ. Polymorphisms in steroid hormone pathway genes and mammographic density. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;77:27-36.

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta isoform (ER beta) of the human estrogen receptor modulates ER alpha transcriptional activity and is a key regulador of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 1999;140:5566-78.

Hallal PC, Dumith SC, Bastos JP, Reichert FF, Siqueira FV, Azevedo MR. Evolução da pesquisa epidemiológica em atividade física no Brasil: revisão sistemática. *Rev Saúde Pública.* 2007;41(3):453-60.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17(5):1474-81.

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

Herrinton LJ, Saftlas AF, Stanford JL, Brinton LA, Wolfe JN. Do alcohol intake and mammographic densities interact in regard to the risk of breast cancer? *Cancer.* 1993;71:3029-35.

Hill WG, Robertson A. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet.* 1968;38:226-31.

Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, Robbins J, Lee RT. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.* 2007;13:970-4.

Hu Z, Song CG, Lu JS, Luo JM, Shen ZZ, Huang W, Shao ZM. A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(12):969-78.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [sitio na internet]. Diretoria e pesquisa. Departamento de População e Indicadores Sociais. [citado 2 fev. 2012]. Disponível em: http://www.datasus.gov.br/ 2012.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. [citado 2 fev. 2012]. Disponível em: http//www.inca.gov.br.

Jakimiuk AJ, Nowicka M, Bogusiewicz M, Adamiak A, Skorupski P, Miotla P, Rechberger T, Haczynski J. Prevalence of estrogen receptor alpha *Pvull* and *Xbal* polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Hitochemica Cytobiologica.* 2007;45(4):331-8.

Javed S, Ali M, Sadia S, Aslam MA, Masood AI, Shaikh RS, Sayyed AH. Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. *Maturitas.* 2011;69(4):377-82.

Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res*. 2003;9:1980-9.

Jeon JH, Kang JH, Kim Y, Lee HY, Choi KS, Jun JK, Oh DK, Lee CY, Ko K, Park EC. Reproductive and hormonal factors associated with fatty on dense breast patterns among Korean women. *Pubmed Cancer Res Treat.* 2011;43(1):42-48.

Keaveney M, Klug J, Dawson MT, Nestor PV, Neilan JG, Ford RC, Gannon F. Evidence for a previously unidentified upstream *éxon* in the human oestrogen receptor gene. *J Mol Endocrinol.* 1991;6:111-5.

Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Kado N, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Honjo H. Oestrogen receptor α gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod*. 2001;16:51-5.

Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 2000; 65:227-51.

Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Genomic organization of the human ERα gene promoter region. *Mol Endocrinol.* 2001;15(12):2057–63.

Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, Singh R, Bhasin S, Jasuja R. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids.* 2011;11:1-7.

Kwok PY, Gu Z.Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today*. 1999;5(12):538-43.

Ladd AMGZ, Vásquez AA, Rivadeneira F, Siemes C, Hofman A, Stricker H Ch, Pols HAP, Uitterlinden AG, van Duijn CM. Estrogen receptor α polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;107:415-9.

Lam PB, Vacek PM, Geller BM, Muss HB. The association of increased weight, body mass index, and tissue density with risk of breast carciboma in Vermont. *Cancer.* 2000;89:369-75.

Lamas JM, Pereira MG. Fatores de risco para ocâncer de mama e para lesões pré-malignas em mulheres assintomáticas no Distrito Federal. *Rev Bras Mastol.*1999; 9:108-14.

Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res*. 2006;8:43-54.

Martin LJ, Boyd NF. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res.* 2008,10:1-14.

Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, Ohnuma T, Arai H, Yasuda M, Tanaka C, Emson PC, Nakamura S, Kawakami H. Lack of na association of estrogen receptor α gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 2000;57(2):236-40.

Massart F, Becherini L, Gennari L, Facchini V, Genazzani AR, Brandi ML. Genotype distribution of estrogen receptor α gene polymorphisms in Italian women with surgical uterine leiomyomas. *Fertil Steril.* 2001;75:567-70.

Matos JC, Pelloso SM, Carvalho MDB. Prevalência de fatores de risco para o câncer de mama no município de Maringá, Paraná. *Rev Latino-Am Enfermagem.* 2010;18(3):57-64.

Miyano M, Kawashima T, Ohyama T. A common feature shared by bent DNA strucutres locating in the eukaryotic promoter region. *Mol Biol Rep.* 2001;28(1):53-61.

Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M. Estrogen receptor alpha (ESR1) *pvull* and *Xbal* gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clin Chim Acta.* 2007;382:100-5.

Moore KL, Dalley AF, Agur AM. *Anatomia orientada para a clínica*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p.98.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Variação genetica em indivíduos e populações: mutação e polimofismo. In: Thompson & Thompson editors. *Genética Médica.* 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p.181-214.

Onland- Moret NC, van Gils CH, Roest M, Grobbee DE & Peeters PHM. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2005;16:1195-202.

Osborne CK & Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2005;23(8):1616-22.

Parl FF, Cavener DR, Dupont WD. Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1989;14:57-64.

Pharoah PDP, Antoniou AC, Easton DF and Ponder BAJ. Polygenes, risk prediction and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:2796-802.

Pharoah PDP, Dunning AM, Ponder BAJ, Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:850-60.

Pichard C, Plu-Bureau G, Neves-e Castro M, Gompel A. Insulin resistence, obesity and breast cancer risk. *Maturitas Eur Menopause J*. 2008;60:19-30.

Pinho VFS & Coutinho ESF. Fatores de risco de câncer de mama: uma visão sistemática de estudos com amostras de mulheres da população geral do Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2005;2(2):351-60.

Pinho VFS & Coutinho ESF. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. *Cad Saúde Pública.* 2007;23(5):1061-9.

Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG. 'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature.* 1983;303:767-70.

Quetelet A. *Physique sociale*: ou , essai sur le développement dês facultes de I 'homme . Brussels, Belgium: C. Muquardt; 1869.

Ramos EHM, Martinelli S, Silva I, Nazário A, Facina G, Costa A, Carvalho C, Souza N. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric.* 2009;1(12):490-501.

Ramos EHM, Kemp C, Silva IDCG. Associação entre os polimorfismos HaeIII e MspI do gene para o receptor alfa de estrogênio e densidade mamográfica em mulheres após a menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006;10(28):581-9.

Saftlas AF & Szklo M. Mammographic parenchymal patterns and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1987;9:146-74.

Sala E, Warren R, McCann J, Duffy S, Luben R, Day N. Mammographic parenchymal patterns and breast cancer natural history: a case-control study. *Acta Oncol.* 2001;40:461-5.

Sand P, Luckhaus C, Schlurmann K, Gotz M, Deckert J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J Neural Transm*. 2002;109:567-83.

Schatz T, Langowski J. Curvature and sequence analysis of eukaryotic promoters. *J Biomol Struct Dyn*. 1997;15(2):265-75.

Schor N, Boim MA, Santos OFP, Silva IDCG, Baracat EC. *Bases moleculares da ginecologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. v.2, p.83-4.

Schuit SC, Oei HH, Witteman JC, Geurts VKCH, van Meurs JB, Nijhuis RL, van Leeuwen JP, de Jong FH, Zillikens MC, Hofman A, Pois HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2004;29(24):2969-77.

Sclowitz ML, Menezes AMB, Gigante DP, Tessaro S. Condutas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. *Rev Saúde Pública.* 2005; 39(3):340-9.

Shen Y, Li DK, Wu J, Zhang Z, gao E. Joint effects of the CYP1A1 Mspl, ERα *Pvull* and ERα *Xbal* polymorphisms on the risk of breast cancer : results from a population-based case-control study in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15:342-7.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* 2004;116:235-46

Shin A, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park SK, Kim SU, Noh DY, Choe KJ, Ahn SH, Hirvonen A, Kim JH, Yoo KY. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;80:127-31.

Speer G, Cseh K, Winkler G, Vargha P, Braun E, Takacs I, Lakatos P. Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and in android type obesity. *Eur J Endocrinol.* 2001;144:385-9.

Sprague BL, Trentham-Dietz A, Gangnon RE, Buist DSM, Burnside ES, Bowles EJA, Stanczky FZ, Sisney GS. Circulating sex hormones and mammographic breast density among postmenopausal women. *Horm Cancer*. 2012;2(1):62-72.

Stomper PC, D'Souza DJ, DiNitto PA, Arredondo MA. Analysis of parenchymal density on mammograms in 1353 women 25-79 years old. *Am J Roentgenol.* 1996; 167:1261-5.

Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M. Polymorphisms of estrogen receptor alpha in prostate cancer. *Mol Carcinog.* 2003;37:202-8.

Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Ega KM, Titus-Ernstoff L, Baron JA, Storer BE, Stampfer M, Willet WC. Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes Control.* 2000;11(6):533-42.

Ursin G, Lillie EO, Lee E, Cockburn M, Schork NJ, Cozen W, Parisky YR, Hamilton AS, Astrahan MA, Mack T. The relative importance of genetics and environment on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2009;18:102-12.

Vachon CM, Kuni CC, Anderson K. Association of mammographically defined percent breast density with epidemiologic risk factors for breast cancer (United states). *Cancer Causes Control*. 2000;11:653-62.

Vachon CM, Sellers TA, Carlson EE, Cunningham JM, Hilker CA, Smalley RL, chaid DJ, Kelemen LE, Couch FJ, Pankratz VS. Strong evidence of a genetic determinant for mammographic density, a major risk factor for breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67:8412-8.

van Duijnhoven FJB, Peeters PHM, Warren RML, Bingham SA, Uitterlinden AG, van Noord PAH, Monninkhof EM, Grobbee DE, van Gils CH. Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of

hormone therapy on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2006;15(3):462-7.

Von Drygalski A, Tran TB, Messer K, Pu M, Corringham S, Nelson C, Ball ED. Obesity is an independent predictor of poor survival in metastatic breast cancer: retrospective analysis of a patient cohort whose treatment included high-dose chemotherapy and autologous stem cell support. *Int J Breast Cancer*. 2011;2011:1-8.

Waard F, Baanders-Van HEA. A prospective study in general practice on breast-cancer risk in postmenopausal women. *Int J Cancer.* 1974;14(2):153-60.

Wang J, Higuchi R, Modugno F, Jia L, Umblas N, Lee J, Lui LY, Ziv E, Tice JÁ, Cummings SR, Rhees B. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;10:273-80.

Wedren S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvanen AC, Kindmark A, Landefren U, Fermer ML, Stiger F, Persson I, Baron J, Weiderpass E. Oestrogen receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res.* 2004;6(4):437-49.

Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedren S, Kindmark A, Baron JA. Estrogen receptor α gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis*. 2000; 21:623-7.

Weigel RJ, Crooks DL, Iglehart JD, deConinck EC. Quantitative analysis of the transcriptional start sites of estrogen receptor in breast carcinoma. *Cell Growth Differentiation.* 1995;6:707-11.

WHO, 2012. [cited 2012 mar. 12]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010.

Wild C. Polymorphisms-screening: genetic testing for predisposition- guidance for technology assessment. Poiesis & Praxis*: Inter J Ethics Science Technology Assessment*. 2008;5(1):1-14.

Wolfe JN. Breast patterns as an index of risk for developing breast cancer. *Am J Roentgenol.* 1976;126:1130-9.

Woolcott CG, Maskarinec G, Haiman CA, Verheus M, Pagano IS, Marchand LL, Henderson B, Kolonel LN. Association between breast cancer susceptibility loci and mammographic density: the multiethnic cohort. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:10-5

Wray NR, Visscher PM. Population genetics and its relevance to gene mapping. In: Neale BNM, Ferreira MAR, Medland SE, Posthuma D, editors. *Statistical genetics: gene mapping through linkage and association.* New York: Taylor & Francis Group; 2008. p.87-112.

Wu PE, Shen CY. 'Hide-then-hit' to explain the importance of genotypic polymorphism of DNA repair genes in determining susceptibility to cancer. *J Mol Cell Biol.* 2011;3:59-65.

Yaich L, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF. Analysis of the *Pvull* restriction fragment-length polymorphism and éxon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res*. 1992,52:77-83.

Zuppan P, Hall JM, Lee MK, Ponglikitmongkol M and King MC. Possible linkage of the estrogen receptor gene to breast cancer in a family with late-onset disease. *Am J Hum Genet.* 1991;48:1065-8.

# APÊNDICES

Copia do artigo Submetido

> Date: Tue, 4 Sep 2012 22:00:52 -0400

> From: gynendo@tiscali.it

> To: marilenealicia@hotmail.com

> Subject: Gynecological Endocrinology - Manuscript ID DGYE-2012-0253

> > 04-Sep-2012

Dear Dr Souza:

>

> Your manuscript entitled "Polymorphisms of estrogen receptor-α gene in Brazilian women with high breast density after menopause" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Gynecological Endocrinology.

>

> Your manuscript ID is DGYE-2012-0253.

>

> Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at http://mc.manuscriptcentral.com/dgye and edit your user information as appropriate.

>

> You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to http://mc.manuscriptcentral.com/dgye .

>

> Thank you for submitting your manuscript to Gynecological Endocrinology.

>

> Sincerely,

> Gynecological Endocrinology Editorial Office

# Polymorphisms of estrogen receptor-α gene in Brazilian women with high breast density after menopause

| | |
|---|---|
| Journal: | *Gynecological Endocrinology* |
| Manuscript ID: | DGYE-2012-0253 |
| Manuscript Type: | Original Paper |
| Date Submitted by the Author: | 04-Sep-2012 |
| Complete List of Authors: | Souza, marilene; Sao Paulo University, Obstetrics and Gynecology<br>Fonseca, Angela; Sao Paulo University, Obstetrics and Gynecology<br>Bagnoli, Vicente; Sao Paulo University, Obstetrics and Gynecology,<br>Barros, Nestor; Sao Paulo University, Radiology<br>Franzolin, Solange; Sao Paulo State University,<br>Carvalho, Katia; Sao Paulo University, Obstetrics and Gynecology,<br>Soares-Jr, José; Federal University of São Paulo, Gynecology<br>Baracat, Edmund; Hospital das Clínicas de São Paulo, Ginecologia |
| Keywords: | Body Mass Index, Breast, Estrogen Receptor |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

# Polymorphisms of estrogen receptor-α gene in Brazilian women with high breast density after menopause

**Abstract:** The association of genetic polymorphism in the estrogen receptor alpha (ERα) gene and risk for diseases including breast cancer (BC) has been the subject of great interest. **Objective:** Checking on women with high breast density after menopause, the frequency of the *Pvull* and *Xbal* polymorphisms of the ERα gene and the correlation between them and the known risk factors for breast cancer. M**ethods:** Observational study with 308 women between 45-65 years-old with high breast density, without hormonal therapy, menstruation for a year or more, breast and ovarian cancer history. It was characterized in clinical history and physical examination: menarche, menopause, parity, family history of BC, smoking, alcohol intake and body mass index. **Results:** The allelic and genotypic frequencies for ERα-*Pvull* and *Xbal*: P = 43.99%; p = 56.01%; *pp* =32.14%; *Pp*= 47.73% and *PP*= 20.13%; *X*= 41.56%; *x*= 58.44%; *xx*= 33.44%; *Xx* =50.00% and *XX* =16.56%, respectively. The most frequent risk factors for BC: menarche before 12 years-old (35.38%), nulliparity or first child after 28 years-old (41.66%), family history of BC (19.16%) and Overweight/obesity (62.01%). **Conclusion:** Allelic and genotypic distribution similar to literature. The risk factors for BC were more prevalent in women with high breast density but without significant associations with these polymorphisms.

For Peer Review Only

**Keywords:** genetic polymorphism, breast neoplasms, risk factors, estrogen receptors, mammography.

## Introduction

The World Health Organization estimates that more than 1 million new cases of BC occur around the world per year, what makes it the most common cancer among women[1].

Mammographic density (MD) is an independent risk factor for BC, showing high risk index (RR = 2 to 6) comparable to other factors: Atypical Epithelial Hyperplasia, mother and sister with BC, proven genetic susceptibility and overcomes factors like: nulliparity, personal history of the hyperplasia without atypia, early menarche and late menopause[2].

Exposure to estrogens during life is a well established risk factor to BC and high MD, because influence the growth, differentiation and function of many target-tissues, including breast, uterus and ovaries[3]. Biological effects of estrogens are mediated through binding affinity with its receptor. Estrogens receptors (ER) are members of the nuclear receptors that control gene transcription. The two main isoforms of ERs are the *α and β*, located on chromosome 6q25.1 and 14q22-24 respectively [4]. There is a special interest in the ERα because its protein is high in cells of malignant breast tumors[5].

The Association of genetic polymorphisms in the *ERα* gene and risk of disease including the BC has been a object of great interest[6, 7, 8, 9]. The aim of this study is to verify the frequency of polymorphisms of ERα *Pvull and Xbal* in women with high breast density after menopause.

For Peer Review Only

## Methods

Observational study of prevalence of gene polymorphisms *ERα Pvull* and *Xbal* in 308 women after menopause, aged 45 to 65, with high breast density evaluated by computerized objective method, no use of hormone therapy for at least one year and without personal history of breast and ovarian cancer selected in the *Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo* (HC-FMUSP) from January 2010 to March 2011. The study was approved by the Ethics Committee for the Analysis of Research Projects-CAPPesq of HC-FMUSP, and all women signed Informed Consent. We characterized: the age of menarche and menopause, parity, family history of breast cancer, smoking, alcohol intake and body mass index (BMI).

The **genomic DNA** was extracted from peripheral blood using QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen), following manufacturer instructions. After DNA quality and integrity evaluation, we performed PCR-RFLP assay for Estrogen Receptor *Pvull* and *Xbal* polymorphism analysis as described by Herrington et al. (2002).

The principle of ***Hardy-Weinberg*** (H-W) was used to check if the genotype frequencies of the *Pvull* and *Xbal* polymorphisms of our population were in genetic equilibrium. Simple mathematical model [$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$] was used to calculate genotype frequencies from allele frequencies.

**Statistical analysis:** The data were described using medium, standard deviation (sd), median, absolute frequency (n) and relative frequency (%).

The analyses were performed using the statistical program PAST version 2.15. The comparison of qualitative variables were obtained by testing $X^2$; for quantitative variables were used "t Test". When it came to more than two variables it was

For Peer Review Only

applied the test of analysis of variance (ANOVA). The value of statistical significance was set at 5%, i.e. $p < 0.05$.

## Results

The distribution of clinical features in our population is shown in table 1. Within the risk factors considered for the BC and high MD, menarche before 12 years old (35.38%), nulliparity or age at the first child after 28 years-old (41.66%), family history (FH) of breast cancer (19.16%) and Overweight/obesity (62.01%) were more prevalent in this population. The caucasian was the most frequent and late menopause age was not a factor of influence.

The average age was quite high (56.31 years). The allele frequencies (table 2) obtained for *ERα-397-Pvull and ERα-351-Xbal* polymorphisms *were:* P = 43.99%, p = 56.01% and *X*= 41.56%; *x*= 58.44%. The genotypic distribution was in *H-W* equilibrium with the following frequencies: genotype *pp* (32.14%); *Pp* (47.73%); *PP* (20.13%) and for *xx* genotype (33.44%); *Xx (*50.00%) and *XX (*16.56%).

The table-3 shows the genotype associations *ERα397-Pvull* and *ERα351-Xbal* with known risk factors for BC and high MD. There was no statistically significant difference, but in absolute numbers , there was higher prevalence of reproductive and environmental risk factors in women with mutated homozygous than wild homozygous.

## Discussion

The polymorphism is a genetic variation of usual occurrence in the general population, found in frequency higher than 1%. There are several known polymorphisms of estrogen receptor alpha gene (*ERα*), some of which can modify the function of the receptor and the action of estrogens. Among the known

For Peer Review Only

polymorphisms, *Pvull and Xbal*, may be involved with increased individual risk for BC and high MD after menopause[4].

In this sense van Duijnhoven et al, studied the influence of the ERα and hormone therapy (HT) in MD (independent risk factor for BC), and observed association between increased breast density and presence of genotype *ERα -397 Pvull* (OR: 2.24), in women having HT. Ramos et al, investigating the genotypic distribution of the polymorphism *Xbal* in women with high breast density after menopause, observed that women with two mutated alleles *xx* were 2.5 times more likely to have high breast density when compared to those with one or two normal alleles for this polymorphism (OR = 2.34). González-Mancha et al, analyzing the presence of variant *Pvull* in 444 women with breast cancer and 704 controls found in genotyping significant representation of the T allele among the cases with family history of cancer compared with controls (0.65 and 0.53 respectively). In this way the role of the polymorphism *Pvull* was statistically significant among cases of family cancer (OR = 3.81).

Javed et al, combined the effects of the age of menopause, *Xbal and Pvull* polymorphisms and the occurrence of breast cancer in the Pakistani population and concluded that the genotype *Xbal* was 45% higher in cases of breast cancer.

The molecular mechanisms by which these polymorphisms alter the activity of the receptor are not clear since *Pvull* and *Xbal* are located in a intronic region, and apparently non-functional of the gene. Possible explanations include: the existence of functional combination among polymorphic alleles where the two markers in combination would change the genetic function as well as the stability of RNA[11]. Another explanation would be that polymorphisms in *íntron* could have a linkage Disequilibrium (LD) with the *éxon* which would affect the function of the ER[12]. In

For Peer Review Only

this sense Shen et al studied together the genotypes ER-α Xbal, ERα *Pvull*, *CYP1A1 Mspl* with the aim of assessing whether the susceptibility of these three haplotypes had cumulative effects for the risk of breast cancer. Their results showed that the combination of allelic variants of three *locus* has increased the risk of breast cancer even more (OR = 8.07).

In our study, the allele frequencies and genotypic obtained for polymorphism *ERα-397-Pvull* (P = 43.99%; p = 56.01%) were similar to those found in other studies that correlated this polymorphism with MD or BC[6,8,14,15,16,17]. The genotypic distribution was in H-W equilibrium with the following frequencies: genotype pp 32.14%; Pp 47.73% and *PP* 20.13% . However the allele frequencies for the polymorphism *Xbal* (*X*= 41.56%; *x*= 58.44%) were lower when compared with the other two studies in the Brazilian population[7,17] , but it was according to the frequency found by van Duijnhoven et al, Molvarec et al, and by Hsieh et al. The genotypic distribution to ERα -351 *Xbal* was also in *H-W* equilibrium with the following frequencies: xx genotype 33.44%; Xx 50.00% and *XX* 16.56% .

In relation to known risk factors for BC and MD, we noted that the homozygous recessive genotype to *Pvull* was influenced by reproductive factors. In the mutated homozygous group (*pp*) the percentage of nulliparous and women who had their first child at full term after 28-years-old were 42.55% and 33.82% respectively. According to the literature, nulliparous women present risk for BC equal to those with birth of first child after 28 years-old[19]. This genotype, in absolute terms, presented early menopause. This data is in concordance to what Gonzales-Mancha et al, who researched the association SNPs *Pvull* and BC in women with menopause at the average age of 47.94 years-old.

For Peer Review Only

As for the risk factors for BC considered modifiable (smoking, alcoholism and obesity/overweight) were present in the genotype ***pp*** 38.64%, 34.00% and 28.30%, and in ***xx*** 34.01%, 32.00% and 35.07%, respectively, suggesting that environmental factors (mitogenic/mutagens) can interfere with this process causing DNA damage. Obesity is the most important determinant of estrogenic level in women after menopause and it is associated with increased risk for BC and worse prognosis after the beginning of the disease[20, 21]. The relative risk for obese women (RR = 1.1-2.0) is comparable to those of HT (American Cancer Society). In our study Overweight/obesity was in absolute numbers more prevalent in the mutated group *p* =56.12% and *xx*=69.22%, factor that may have influenced this high prevalence of obese women in a group composed only by women with high breast density. As we all know, in previous research, obesity is an important determinant for breast not dense [7,22].

A data that also drew attention was the number of women with a FH of BC. In the total sample, 19.16% had a first-degree relative with BC and when we stratify to *Pvull* and *Xbal* this percentage rises to 28.81%. This shows the importance of hereditary factor of polymorphism that are according to the literature as noted by Shen et al, who found positive association of these polymorphisms only in women with FH for BC: genotype *pp* without FH and with FH (OR = 1.12 and 3.04) and *xx* genotype (OR = 0.99 and 4.20), respectively.

For the *Xbal* polymorphism the reproductive factors were also more prevalent in absolute numbers, but no statistically significant difference. Nulliparity (36.76%) and age by having the first child after 28 years-old (34.04%). Differently from *Pvull*, menopause after 50 years-old was present in 35.06% in this genotype, against 32.90% before 50 years-old. Javet et al, combining the effects of the age of

For Peer Review Only

menopause, *Xbal* and *Pvull* polymorphisms and the occurrence of BC concluded that the genotype *Xbal* was 45% higher in cases of BC.

Investigating the combination of *Pvull* and *Xbal* polymorphisms in this study was found that these were in Linkage Disequilibrium (D´ = 0.396). It was observed that the haplotype *ppxx* (20.13%), which is theoretically the highest risk for the increase of MD and BC, was more prevalent that the haplotype of lower risk *PPXX* (14,61%).

## Conclusion

The risk factors for breast cancer and the ERα gene polymorphisms were more prevalent in women with high breast density, however additional case-control studies are needed for a better understanding between these polymorphisms and breast cancer.

**Conflict of interest**: The authors report no conflicts of interest.

**Financial support:** FAPESP – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process: 2009/54563-0).

## References

1 WHO, 2012. *HTTP://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010*. Accessed on march, 2012.

For Peer Review Only

2 Martin LJ & Boyd NF. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. Breast Cancer Res. 2008,10:1-14.

3 Jensen EV & Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. Clinical Cancer Res. 2003;9:1980-1989.

4 Cai Q, Shu XO, Jin F, Daí Q, Wen W, Cheng JR, et al. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor α gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study . Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12(9):853-859.

5 Allred DC, Brown P, Medina D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. Breast Cancer Res. 2004;6:240-245.

6 Van Duijnhoven FJB, Peeters PHM, Warren RML, Bingham SA, Uitterlinden AG, van Noord PAH, et al. Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy on mammographic density. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006; 15(3):462-467.

7 Ramos EHM, Martinelli S, Silva I, Nazário A, Facina G, Costa A, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. Climacteric. 2009;1(12):490-501.

For Peer Review Only

8 González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, Pérez LI, González-Perez A, Morón FJ, et al. Analysis of the ER alpha germline *Pvull* marker in breast cancer risk. Med Sci Monit. 2008;14:136-143.

9 Javed S, Ali M, Sadia S, Aslam MA, Masood AI, Shaikh RS, et al. Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. Maturitas. 2011;69(4):377-382.

10 Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng S, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. N Engl J Med. 2002,346(13):967-74.

11 Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvanen AC, Kindmark A, et al. Oestrogen receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. Breast Cancer Res. 2004; 6(4):437-449.

12 Gennari L, Merlotti D, Paola VD, Calabro A, Becherini L, Martini G, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A HuGE review. American Journal of Epidemiology. 2004;161(4):307-320.

13 Shen Y, Li DK, Wu J, Zhang Z, gao E. Joint effects of the CYP1A1 Mspl, ERα *Pvull* and ERα *Xbal* polymorphisms on the risk of breast cancer : results from a population-based case-control study in Shanghai. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 2006;15:342-347.

For Review Only

14 Hu Z, Song CG, Lu JS, Luo JM, Shen ZZ, Huang W, et al. A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. Journal of Cancer Res and Clinical Oncology. 2007;133(12):969-978.

15 Onland- Moret NC, van Gils CH, Roest M, Grobbee DE & Peeters PHM. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk. Cancer Causes and Control. 2005;16:1195-1202.

16 Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. Nature Medicine. 2007;13:970-974.

17 Giacomazzi J. Fatores de risco para o câncer de mama e polimorfismos nos genes ER, PR e STK15 em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

18 Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M. Estrogen receptor alpha (ESR1) *pvull* and *Xbal* gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. Clinica Chimica Acta. 2007;382:100-105.

For Peer Review Only

19 Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. Breast Cancer Res. 2006; 8: 43-54.

20 Barlow WE, Hite E, Ballard-Barbash R, Vacek PM, Titus-Ernstoff L, Carney PA, et al. Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. Journal of the National Cancer Institute. 2006; 17(98):1204-1214.

21 Pichard C, Plu-Bureau G, Neves-e Castro M, Gompel A. Insulin resistence, obesity and breast cancer risk. Maturitas The Europen Menopause Journal. 2008;60:19-30.

22 Jeon JH, Kang JH, Kim Y, Lee HY, Choi KS, Jun JK, et al. Reproductive and hormonal factors associated with fatty on dense breast patterns among Korean women. Pubmed Cancer research and Treatment. 2011,43(1):42-48.

For Peer Review Only

**Table 1 – description of qualitative variables**

| Feature | | n | % |
|---|---|---|---|
| Race/Ethnicity | Asian | 15 | 4.87 |
| | Caucasian | 180 | 58.44 |
| | Afro-brazilian | 113 | 36.69 |
| Body Mass Index (BMI) | Normal | 117 | 37.99 |
| | Overweight | 78 | 25.32 |
| | Obesity | 113 | 36.69 |
| Age at having the first child | Up to 28 years | 193 | 80.41 |
| | > 28 years | 47 | 19.58 |
| Menopause | Up to 50 years | 231 | 75 |
| | > 50 years | 77 | 25 |
| Menarche | Up to 12 years | 109 | 35.38 |
| | > 12 years | 199 | 64.61 |
| Number of pregnancy | 0 | 60 | 19.48 |
| | 1 - 3 | 166 | 53.90 |
| | > 3 | 82 | 26.62 |
| Number of births (parity) | 0 | 68 | 22.08 |
| | 1 - 3 | 198 | 64.29 |
| | > 3 | 42 | 13.64 |
| Smoke | Not | 264 | 85.71 |
| | Yes | 44 | 14.29 |
| Alcohol | Not | 258 | 83.77 |
| | Yes | 50 | 16.23 |
| Metabolic syndrome | Not | 220 | 71.43 |
| | Yes | 88 | 28.57 |
| Family history of breast cancer | Not | 249 | 80.84 |
| | Yes | 59 | 19.16 |

For Peer Review Only

**Table 2 – Distribution of polymorphisms with verification of Hardy-Weinberg equilibrium**

| Polymorphism | | Observed | | Expected | | H-W equilibrium |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | n | % | n | % | P |
| Pvu ll | pp | 100 | 32.47 | 97.7 | 31.73 | |
| | Pp | 147 | 47.73 | 151.5 | 49.20 | 0.600 ns |
| | PP | 61 | 19.81 | 58.7 | 19.07 | |
| | Allele Frequency p | 347 | 56.33 | | | |
| | Allele Frequency P | 269 | 43.67 | | | |
| Xba l | xx | 103 | 33.44 | 105.2 | 34.15 | |
| | Xx | 154 | 50.00 | 149.6 | 48.57 | 0.607 ns |
| | XX | 51 | 16.56 | 53.2 | 17.27 | |
| | Allele Frequency x | 360 | 58.44 | | | |
| | Allele Frequency X | 256 | 41.56 | | | |

ns-difference not significant for the H-W equilibrium

For Peer Review Only

**Table 3-Polymorphism of *ER-α Pvull* and *Xbal***

| | Polymorphism of *ER-α Pvull* | | Polymorphism of *ERα-Xbal* | |
|---|---|---|---|---|
| | *pp* n (%) | *Pp or PP* n (%) | *xx* n (%) | *Xx* or *XX* n (%) |
| Race/Ethnicity | | | | |
| Asian | 7 (46.67) | 8 (53.33) | 5 (33.30) | 10 (66.67) |
| Caucasian | 55 (30.56) | 125 (69.44) | 62 (34.44) | 118 (65.56) |
| Afro-brazilian | 37 (32.74) | 76(67.72) | 36 (31.85) | 77 (68,14) |
| | p = 0.618 | | p = 0.286 | |
| Number of births | | | | |
| 0 | 23 (33.82) | 45 (66.18) | 25 (36.76) | 43 (63.24) |
| 1 to 3 | 65 (32.83) | 133 (67.17) | 62 (31.31) | 136 (68.69) |
| >3 | 12 (28.57) | 30 (71.43) | 16 (38.10) | 26 (61.90) |
| | p = 0.835 | | p = 0.563 | |
| Date of the last menstruation | | | | |
| Up to 50 years | 77 (33.33) | 154 (66.67) | 76 (32.90) | 155 (67.10) |
| > 50 years | 23 (29.97) | 54 (70.13) | 27 (35.06) | 50 (64.94) |
| | p = 0.574 | | p = 0.727 | |
| Age at having the first child | | | | |
| Up to 28 years | 57 (29.53) | 136 (70.47) | 62 (32.12) | 131 (67.88) |
| > 28 years | 20 (42.55) | 27 (57.45) | 16 (34.04) | 31 (65.96) |
| | p = 0.086 | | p = 0.801 | |
| Age of menarche | | | | |
| Up to 12 years | 36 (33.03) | 73 (67.97) | 37 (33.94) | 72 (66.06) |
| > 12 years | 64 (32.16) | 135 (67.84) | 66 (33.17) | 133 (66.83) |
| | p = 0.877 | | p = 0.890 | |
| Smoke | | | | |
| Not | 83 (31.44) | 181 (68.56) | 88 (33.33) | 176 (66.67) |
| Yes | 17 (38.64) | 27 (61.36) | 15 (34.09) | 29 (65.91) |
| | p = 0.345 | | p = 0.921 | |
| Alcohol | | | | |
| Not | 83 (32.27) | 175 (67.83) | 87 (33.72) | 171 (66.28) |
| Yes | 17 (34.00) | 33 (66.00) | 16 (32.00) | 34 (68.00) |
| | p = 0.800 | | p = 0.813 | |
| Family history | | | | |
| Not | 83 (33.33) | 166 (66.67) | 86 (34.54) | 163 (65.46) |
| Yes | 17 (28.81) | 42 (71.19) | 17 (28.81) | 42 (71.19) |
| | p = 0.505 | | p = 0.402 | |
| Body Mass Index | | | | |
| Normal | 46 (39.32) | 71 (60.68) | 36 (30.77) | 81 (69.23) |
| Overweight | 21 (26.92) | 57 (73.08) | 25 (32.05) | 53 (67.95) |
| Obese | 33 (29.20) | 80 (70.80) | 42 (37.17) | 71 (62.83) |
| | p = 0.126 | | p = 0.563 | |

For Peer Review Only

## Trabalhos realizados durante a pós-graduação

### ARTIGOS PUBLICADOS

**-Tratamento hormonal do hirsutismo baseado em evidência.**

Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, Wilson Maça Yuki Arie, Fábio Bagnoli, **Marilene Alicia Souza**, Edmund Chada Baracat.

Femina 2010; 38: 402-413.

**-Ooforectomia profilática na histerectomia por agravo uterino benigno: evidências atuais.**

José Mendes Aldrighi, Luis Paulo Wolff, **Marilene Alicia Souza**, Vilmar Marques de Oliveira, Tsutomu Aoki.

RAMB 2009;55: 236-7.

**- Construction and validation of an instrument that breaks the silence: the impact of domestic and/or sexual violence on women's health as shown during climaterium.**

Sandra Dircinha Teixeira Araujo Moraes, Angela Maggio da Fonseca, José Maria Soares Júnior, Vicente Renato Bagnoli, **Marilene Alicia Souza**, Wilson Maça Yuki Arie, Edmund Chada Baracat.

Menopause. 2012; 19(1):16-22.

### ARTIGOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO

**- Relationship of age and body mass on the intensity of menopausal symptoms in 5.968 Brazilian women.**

Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, **Marilene Alicia Souza**, Raymundo Soares Azevedo, Euro de Barros Couto Junior, José Maria Soares Júnior, Edmund Chada Baracat.

Enviado e aceito para publicação – Gynecological Endocrinology, 2012.

**- Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco de câncer de mama.**

**Marilene Alicia Souza**, Angela maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, José Maria Soares Júnior, Nestor de Barros, Solange de O B Franzolin, Edmund Chada Baracat.

Enviado e aceito para publicação - Revista Femina

**- Tratamento da mulher climatérica.**

Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, **Marilene Alicia Souza**, Sandra Dircinha Teixeira de Araújo Moraes, José Maria Soares Júnior, Edmund Chada Baracat.

Enviado e aceito para publicação – Revista Brasileira de Medicina

**COLABORADORA EM LIVROS**

**-Dados Demográficos, Epidemiológicos e Clínicos de Mulheres Brasileiras Climatéricas**.

Editores: Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, Wilson Maça Yuki Arie, Raymundo Soares de Azevedo Neto, Euro de Barros Couto Júnior, Edmund Chada Baracat.

Casa Leitura Médica, São Paulo, 2010. 144p.

## CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

**-História da Interrupção da gravidez, do infanticídio e da esterilização. In: História da Anticoncepção**.

Vicente Renato Bagnoli, Josefina Odete Polak Massabki, Márcia Aparecida Faria de Pádua, **Marilene Alicia Souza** et al.

Casa Leitura Médica, São Paulo, 2009. Pg 139.

**- Climatério e Menopausa. In: Zalli M, Benghi RAC, Sparrenberger F & Machado JNP (eds) – Liga interdisciplinar da Terceira Idade 0 LITI - Geriatria para Clínicos. Medicina Aplicada à Terceira Idade.**

Angela maggio da Fonseca, Edmundo Chada Baracat, Marilene Alicia Souza, Vicente Renato Bagnoli, Wilson Maça Yuki Arie.

Editora Revinter, Blumenau, 2012. Capítulo 48: Pg 300-7.

## CAPÍTULOS DE LIVRO EM PUBLICAÇÃO

**- Amenorréia primária – diagnóstico e tratamento**

**Marilene Alicia Souza**, Angela Maggio da Fonseca, Josefina Odete Polak Massabki, José Maria Soares Junior, Edmund Chada Baracat.

Livro: Medicina Baseada Em Evidências - Setor Ginecologia Endócrina e Climatério.

Editor: Edmund Chada Baracat

**- Distúrbios do sono no climatério**

Sandra Dircinha Teixeira de Araújo Moraes, Eli Mendes de Moraes, Angela Maggio da Fonseca, Jucilene Salles da Paixão Silva, **Marilene Alicia Souza.**

Livro: Medicina Baseada Em Evidências - Setor Ginecologia Endócrina e Climatério.

Editor: Edmund Chada Baracat

**- Síndrome de Sheehan**

**Marilene Alicia Souza**, Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, Ana Lucia Cavalcanti.

Livro: Casos Clínicos - Ginecologia Endócrina.

Editor: Edmund Chada Baracat

**- Amenorréia Secundária**

Pérsio Yvon Adri Cezarino, Vicente Renato Bagnoli, Angela Maggio da Fonseca, **Marilene Alicia de Souza.**

Livro: Casos Clínicos - Ginecologia Endócrina.

Editor: Edmund Chada Baracat

**- Hermafroditismo Verdadeiro**

Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, Jucilene Sales da Paixão Silva, **Marilene Alicia de Souza.**

Livro: Casos Clínicos - Ginecologia Endócrina.

Editor: Edmund Chada Baracat

**- Amenorréia**

Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, **Marilene Alicia Souza**, Erika Neves, Edmund Chada Baracat.

Livro: Diagnóstico e Tratamento em Clínica Médica.

Editor: Antonio Carlos Lopes

**- Assistência à mulher no climatério e na sensibilidade.**

Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, Erika Mendonça das Neves, **Marilene Alicia Souza**, Paulo Augusto de Almeida Junqueira, José Aristodemo Pinotti.

Livro: Tratado de Clínica Médica

Editor: Antônio Carlos Lopes

**APRESENTAÇÃO DE POSTERS**

**- Tumor desmoíde pélvico diagnosticado em decorrência da gestação: relato de caso e revisão da literatura.**

Vicente Renato Bagnoli, Angela Maggio da Fonseca, Sandra Dircinha Teixeira de Araújo Moraes, **Marilene Alicia Souza**, Ana Lúcia Cavalcanti, Érika Mendonça das Neves.

Apresentado na 26ª Jornada de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, em São Paulo. 2012.

**-Gene estrogen receptor polymorphism as a risk in the breast cancer.**

**Marilene Alicia Souza**, Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, José Maria Soares Júnior, Edmund Chada Baracat.

Apresentado no 15º World Congress Of Gynecological Endocrinology, em Florence, Itália. 2012.

**-Alimento à base de isolado protéico de soja rico em isoflavonas e os sintomas do climatério.**

Apresentado no IV Congresso Brasileiro de Fitomedicina, em São Paulo, São Paulo 2009.

Ester Laudana, Vicente Renato Bagnoli, Angela Maggio da Fonseca, Cecília Del Giorno, Eliane Guimarães labe, **Marilene Alicia Souza**, Alexandre Castelo Branco de Luca, Ceci Mendes Carvalho Lopes.

**-Síndrome de Sheehan com preservação das gonodotrofinas.**

Apresentado no World Symposium on Gynecological Endocrinology, em Salvador, Bahia. 2009.

**Marilene Alicia Souza.**

**-Prevalência de doenças de mulheres no climatério vítimas de violência doméstica e/ou sexual.**

Apresentado no World Symposium on Gynecological Endocrinology, em Salvador, Bahia. 2009.

Sandra Dircinha Teixeira de Araújo Moraes, Vicente Renato Bagnoli, Angela Maggio da Fonseca, Neuber Segri, Pérsio Yvon Adri Cezarino, **Marilene Alicia Souza**.

**PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS**

**-Contracepção e câncer de mama e TH câncer de mama: Posso usar TH em quem tem risco para o câncer de mama? Como tratar o climatério da mulher com câncer de mama?**

Debatedora no 1º Simpósio de Mastologia, Oncologia e Imaginologia Mamária, em Bauru, São Paulo. 2012.

**ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS**

**- Organizadora da Primeira Jornada de Ginecologia Endócrina de Bauru e Região. APM Bauru. 2008.**

**- Organizadora da Segunda Jornada de Ginecologia Endócrina de Bauru e Região. APM Bauru. 2010.**