ALICE APARECIDA RODRIGUES FERREIRA FRANCISCO

**Análise de polimorfismos de genes envolvidos no
metabolismo e em receptores de estrogênio em mulheres
sadias e em portadoras de carcinoma mamário**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

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

Francisco, Alice Aparecida Rodrigues Ferreira

Análise de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo e em receptores de estrogênio em mulheres sadias e em portadoras de carcinoma mamário / Alice Aparecida Rodrigues Ferreira Francisco. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Estrogênios 3.Neoplasias da mama

USP/FM/DBD-184/12

Dedicatória

A minha mãe, **Neusa**. Exemplo de mãe e de mulher, de força e coragem.

Minha razão de viver e de lutar.

Aos meus avós **Olimpio** e **Alice**. Os maiores exemplos de honestidade e amor ao próximo que alguém pode ter tido na vida.

Ao meu filho **João Henrique**, a quem tanto amo e quero ensinar bons exemplos.

Ao meu marido **Mauricio**, por todo amor, compreensão e cumplicidade.

Agradecimentos

A **Deus**, por sua presença em minha vida e por me permitir nunca perder a fé.

A minha família, meu marido **Mauricio**, meu filho **João Henrique**, tia **Lourdes**, meus irmãos **Flávia, Leandro e Vinicius**, por toda dedicação e força, sempre.

Aos **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat e Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel**, pelo apoio, carinho e atenção durante toda a execução deste trabalho.

Ao **Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, Prof. Dr. João Carlos Sampaio Góes, Prof. Dr. Marcelo Alvarenga Calil, Prof. Dr. Edison Mantovani Barbosa, Prof. Dr. Eduardo Carneiro de Lyra, Prof. Dr. Joaquim Teodoro de Araújo Neto**, pelos ensinamentos transmitidos durante a residência médica, pelo incentivo a realização da pós-graduação e ajuda na captação de participantes.

Aos amigos do LIM-58, **Dra. Kátia Cândido Carvalho, Marinalva Almeida, Nathália Garcia, Rodrigo Marcondes e Thiago Hideki**, agradeço imensamente pela paciência, pela ajuda, pela amizade.

Ao **Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Dra. Ana Maria Massad Costa**, pela ajuda na captação de pacientes participantes.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo fornecimento de auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo (projeto número 2011/13900-4).

Aos ***Drs. Diogo Bugano Diniz Gomes, Rafael Haddad Astolfi e Rafael Ribeiro Martini***, pelo auxílio e pela amizade.

Aos colegas de residência médica em Mastologia ***Drs. Cintia Flores Rolim, Karina Patrício Infante, Manoel Carlos Melilo Felzener, Eurípedes Carlos de Carvalho Filho***, pela amizade e pela ajuda na captação de participantes para a pesquisa.

A todas as ***mulheres*** que se dispuseram a participar deste estudo.

*"Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro
promover o seu aperfeiçoamento pessoal
e realizar inovações no seu próprio interior."*

Dalai Lama

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. Divisão 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: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Os dados desta tese foram utilizados na produção dos seguintes artigos científicos:

“Polymorphisms of genes involved in estrogen metabolism and receptor in breast cancer patients”.

Astolfi RH, Bugano DDG, Francisco AARF, Souza MMT, Ono-Nita SK, Baracat EC. Is Gilbert syndrome a new risk factor for breast cancer? *Med Hypotheses* 2011; 77(2): 162-164.

Dados apresentados parcialmente:

“V Jornada Paulista de Mastologia” – São Paulo, 2009.

“San Antonio Breast Cancer Symposium” – San Antonio, Texas, Estados Unidos, Dezembro 2010.

“4º Simpósio Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP” – São Paulo, 2010.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Metabolismo e ação do estrogênio	3
1.2 - Receptor de estrogênio (ER)	6
1.3 - Genes envolvidos na biossíntese e metabolização do estrogênio ..	8
2 - OBJETIVOS	13
3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1 - Seleção das pacientes	14
3.2 - Entrevistas e coleta de amostras biológicas	14
3.3 - Execução dos protocolos de biologia molecular	15
3.4 - Extração do DNA genômico	16
3.5 - Análise do polimorfismo gênico por PCR-RFLP	16
3.6 - Análise do polimorfismo gênico de UGT1A1*28	18
3.7 - Método estatístico	19
4 - RESULTADOS	21
4.1 - Dados epidemiológicos	21
4.2 - Genotipagem	22
5 - DISCUSSÃO	28
6 - CONCLUSÕES	34
7 – ANEXOS	35
8 - REFERÊNCIAS	41
Is Gilbert syndrome a new risk factor for breast cancer? Med Hypotheses 2011; 77(2): 162-164	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACO	Anticoncepcional
AHH	Aril hidrocarbono hidroxilase
BI-RADS	Breast Imaging Report Data System
CM	Câncer de mama
COMT	Catecol-O-metil transferase
CYP	Citocromo P450
DP	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento derivado do endotélio
ER	Receptor de estrogênio
ESR	Gene do receptor de estrogênio
GST	Glutathione S-transferase
IMC	Índice de massa corpórea
OH-E1	Hidroxiestrogênio-1
OH-E2	Hidroxiestrogênio-2
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SULT	Sulfotransferase
TGF α	Fator transformador de crescimento alfa
TRH	Terapia de reposição hormonal
UDLT	Unidade ducto lobular terminal
UGT	Uridina glucuronosil transferase

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e as enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo estudado	18
Tabela 2	Características gerais da amostra	22
Tabela 3	Resultados das genotipagens em UGT1A1, CYP1A1, COMT, PvuII, XbaI e CYP3A4	23
Tabela 4	Análise genotípica do grupo “estudo” para UGT1A1, CYP1A1, COMT, PvuII, XbaI e CYP3A4	24

Lista de Figuras

Figura 1	Síntese e degradação de estrogênio	5
Figura 2	Metabolismo do estrogênio pela via de conjugação	6
Figura 3	Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para CYP1A1 com <i>MspI</i> , em gel de agarose a 2%	25
Figura 4	Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para COMT, em gel de agarose a 2%	25
Figura 5	Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para CYP3A4, em gel de agarose a 2%	26
Figura 6	Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para ESR1, em gel de agarose a 3%	26
Figura 7	Sequenciamento de UGT1A1	27

Resumo

Francisco AARF. *Análise de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo e em receptores de estrogênio em mulheres sadias e em portadoras de carcinoma mamário* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 50p.

INTRODUÇÃO: O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum no sexo feminino e a segunda causa de óbito por câncer na mulher. Apesar dos avanços no conhecimento da patogênese e dos aspectos moleculares da doença, a exposição prolongada tanto ao estrogênio endógeno quanto exógeno constitui importante fator na carcinogênese mamária. Produtos da degradação e inativação do estrogênio podem ter ação proliferativa e causar danos ao DNA. Genes de baixa penetrância relacionados ao metabolismo hormonal, atuando em conjunto com fatores comportamentais e endógenos, podem ser responsáveis por parte dos casos de câncer de mama, atuando em conjunto a genes de alta penetrância. **OBJETIVOS:** Analisar polimorfismos no receptor de estrogênio e em genes relacionados ao seu metabolismo em mulheres com e sem câncer de mama, observando suas frequências em cada um dos grupos. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Foram incluídas mulheres portadoras de carcinoma mamário recém-diagnosticado, com idade superior a 40 anos e sem histórico de outros tipos de neoplasia maligna (grupo “estudo”) e mulheres sem câncer de mama, apresentando exame mamográfico normal realizado há no máximo 12 meses, com mais de 40 anos de idade e sem histórico de câncer (grupo “controle”). Foi realizada coleta de sangue periférico para extração e análise de DNA genômico. Avaliaram-se os polimorfismos em CYP1A1 MspI, CYP3A4*1B, COMT L/L, ESR1 PvuII e XbaI e UGT1A1*28. **RESULTADOS:** Os polimorfismos em UGT1A1*28 e ESR1 PvuII foram mais frequentes no grupo de mulheres com câncer de mama, porém sem atingir significância estatística. As mutações em ESR1 XbaI, CYP3A4*1B e CYP1A1 MspI foram mais frequentes no grupo controle, também sem significância estatística. Já o genótipo L/L do gene COMT foi mais significativamente mais frequente no grupo controle. **CONCLUSÕES:** A frequência de polimorfismos em UGT1A1*28 e ESR1 PvuII foi de 16,8% e 39,4% nas mulheres com câncer de mama e 10,8% e 18,3% nas sem câncer. A frequência de mutações em ESR1 XbaI, CYP3A4*1B e CYP1A1 MspI foi de 15,1, 44,2 e 3,6% nas mulheres sem câncer de mama e de 25, 22,2% e 0 nas com câncer de mama. O genótipo L/L do gene COMT foi significativamente mais frequente no grupo controle (28,9 vs. 8,6%), sugerindo que este polimorfismo poderia ser um fator protetor ao câncer de mama na população estudada.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Estrogênios 3.Neoplasias da mama

Abstract

Francisco AARF. *Analysis of polymorphisms in genes involved in metabolism and estrogen receptors on healthy women and women with breast carcinoma* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 50p.

INTRODUCTION: Breast cancer is the most common malignancy in women and second leading cause of cancer death in women. Despite advances in studies on the pathogenesis and molecular aspects of the disease, prolonged exposure to endogenous and exogenous estrogen is an important factor for mammary carcinogenesis. Products of degradation and inactivation of estrogen may have proliferative action and cause DNA damage. Low penetrance genes related to hormone metabolism, acting in conjunction with behavioral and endogenous factors may be responsible for most cases of breast cancer, and together with high penetrance genes. **OBJECTIVES:** To analyze polymorphisms in genes related to the estrogen receptor and metabolism in patients with and without breast cancer, observing the frequencies in each group. **MATERIALS AND METHODS:** We included women with newly diagnosed breast cancer, aged 40 years or more and without history of other types of malignancy ("study" group) and women without breast cancer, with a normal mammography performed for no more than 12 months, with more than 40 years old and no history of cancer ("control" group). A sample of peripheral was collected for genomic DNA extraction and analysis. The polymorphisms in CYP1A1 MspI, CYP3A4*1B, COMT L/L, ESR1 PvuII and XbaI and UGT1A1*28 were evaluated. **RESULTS:** The polymorphisms in UGT1A1*28 and ESR1 PvuII were more frequent in the group of women with breast cancer, without reaching statistical significance. The mutations in ESR1 XbaI, CYP3A4*1B and CYP1A1 MspI were more frequent in the control group, also not statistically significant. The COMT genotype L/L was significantly more frequent in control group. **CONCLUSIONS:** The frequency of polymorphisms in UGT1A1*28 and ESR1 PvuII was 16.8% and 39.4% in women with breast cancer and 10.8% and 18.3% in those without cancer. The frequency of mutations in ESR1 XbaI, CYP3A4*1B and CYP1A1 MspI was 15.1, 44.2 and 3.6% in women without breast cancer and 25, 22.2 and 0% in breast cancer. The L/L genotype of the COMT gene was significantly more frequent in the control group (28.9 vs. 8.6%), suggesting that this polymorphism could be a protective factor against breast cancer in this population.

Descriptors: 1.Polymorphism, genetic 2.Estrogens 3.Breast neoplasms

1 - INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama (CM) é uma neoplasia epitelial maligna que se caracteriza pela invasão tecidual adjacente e pela tendência a metastatização a sítios distantes (Ellis et al., 2003). Na maioria das vezes, os tumores são do tipo adenocarcinoma, derivados da unidade ducto lobular terminal (UDLT), a unidade funcional da mama. Cerca de 90% dos casos são não hereditários (esporádicos) e somente 10% familiares (Travis e Key, 2003; Bland e Copeland, 2010).

No Brasil, estimam-se 53 mil casos novos diagnosticados em 2012, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012). É a neoplasia maligna mais comum no sexo feminino, à exceção dos tumores de pele não melanoma. Nos Estados Unidos, a estimativa de incidência para 2011 foi de 231 mil casos novos de câncer de mama, porém, em 93% a doença estaria confinada à mama ou somente apresentaria comprometimento linfonodal axilar (SEER, 2011). Estudo brasileiro realizado na cidade de Goiânia mostrou que 65% dos casos apresentam, ao diagnóstico, comprometimento axilar ou regional (Freitas et al., 2006).

Apesar dos avanços no conhecimento da patogênese e dos aspectos moleculares da doença, a exposição prolongada tanto ao estrogênio endógeno quanto exógeno constitui importante fator na carcinogênese mamária (Toniolo et al., 1995; Zeleniuch-Jacquotte et al., 1995; Yager e Davidson, 2006). Outros fatores de risco associados à iniciação e ao

desenvolvimento são: grande número de ciclos ovulatórios devido à menarca precoce ou menopausa tardia; nuli ou primiparidade tardia; alta densidade mamária (principalmente na pós-menopausa); mutações genéticas (como BRCA1 e BRCA2); uso de terapia hormonal e obesidade na pós-menopausa (Zeleniuch-Jacquotte et al., 1995; Liehr, 2000; Clemons e Goss, 2001; Yager e Davidson, 2006).

Sabe-se que o estrogênio se associa à proliferação e à maturação do tecido mamário. Age através de receptores intracelulares, ativando fatores de transcrição, como DNA mitocondrial, produzindo mensageiros secundários, fator transformador de crescimento alfa (TGF α) e fator de crescimento derivado de endotélio (EGF) (Liehr, 2000; Shatalova et al., 2006). Estudos sugerem que substâncias derivadas da degradação e inativação do estrogênio possuem ação proliferativa e causariam danos ao DNA, sendo também importantes na carcinogênese mamária (Liehr, 2000; Yager, 2000; Clemons e Goss, 2001).

Os estudos Framingham Heart Study e Shanghai Breast Cancer Study correlacionaram alterações no metabolismo do estrogênio a polimorfismos de genes relacionados ao seu metabolismo, sugerindo que teriam papel importante no risco individual para o CM (Murabito et al., 2007; Adams et al., 2006).

Sabe-se que muitas doenças não são monogenéticas em sua origem, mas sim resultantes de complexa interação entre diversos genes e fatores ambientais. Genes de baixa penetrância, atuando juntamente com fatores comportamentais e endógenos, seriam igualmente responsáveis por parte

dos casos de CM e, provavelmente, teriam sua ação ligada a outros genes, de alta penetrância (Guengerich, 1999; Bugano et al., 2008). Entre eles, os candidatos mais importantes seriam genes envolvidos no reparo ao DNA, metabolismo de esteróides, controle do ciclo celular e transdução de sinais (Coughlin e Piper, 1999; Han et al., 2004; Pharoah et al., 2006; Pharoah et al., 2008).

Sabe-se que o estrogênio pode induzir a danos genéticos pela ligação covalente direta dos seus metabólitos ao DNA ou por dano direto ao DNA, ou ainda por meio da produção de radicais livres (Cavalieri et al., 1997; Alves-Silva et al., 2000; Hefler et al., 2004). Outra hipótese para a atuação desse hormônio na carcinogênese mamária seria a proliferação de células malignas (Dunning et al., 1999; Barros, 2006; Barros, 2010). Observa-se haver também variação interindividual com relação ao metabolismo de agentes carcinogênicos e à biossíntese e metabolização de hormônios esteróides, atribuídas aos polimorfismos genéticos (Waxman et al., 1988; Niwa et al., 1998; Santos, 2007; Bugano et al., 2008).

1.1 - Metabolismo e ação do estrogênio

A figura 1 mostra a via de síntese do estrogênio. Como se depreende, a deidroepiandrosterona, produzida pelas glândulas adrenais, é convertida em testosterona e androstenediona pelas enzimas do grupo CYP17. Estes hormônios são metabolizados posteriormente nos ovários pelas aromatases,

pertencentes ao complexo CYP19, em estradiol e estrona, respectivamente, que tem ação predominante no tecido mamário. Isto ocorre na primeira metade do ciclo ovulatório. Esta conversão também pode se dar no tecido adiposo, fígado, músculos e no tecido mamário (Liehr, 2000).

A produção extra-ovariana de estrona e estradiol é particularmente importante na pós-menopausa, quando a concentração de estrogênio no tecido mamário pode ser de até cinquenta vezes o valor da concentração sérica. Em diversos tecidos, a estrona e o estradiol podem ser convertidos por enzimas do complexo CYP (Niwa et al., 1998; Bugano et al., 2008).

O metabolismo primário do estrogênio pode seguir duas vias diferentes:

- Hidroxilação: no fígado, na mama e em outros tecidos, as enzimas relacionadas ao complexo P450 promovem a hidroxilação do estrogênio, gerando compostos que serão novamente metabolizados (Modugno et al., 2003; Schaik, 2005).

- a) 16 α -hidroxiestrogênio (16 α OHE1, 16 α OHE2): produzido pelas enzimas do complexo CYP1A1 em pequenas quantidades, depois metabolizado pela UDPGlucuronosiltransferase 2 (UGT1A1) (Waxman et al., 1988; Adegoke et al., 2004).

- b) Catecolestrogênio:

- 2-hidroxiestrogênio e 4-hidroxiestrogênio: são os principais metabólitos do estrogênio, produzidos pelos complexos CYP1A1 e CYP1A2 (2-OHE1/ 2-OHE2), CYP1B1 (4-OHE1/ 4-OHE2) e CYP3A4 (ambos), metilados pela catecol-O-metiltransferase (COMT). Os produtos desta reação são conjugados a sulfato e glucuronil pelas enzimas sulfotransferase

A1 (SULT-A1) e UGT1A1. O 2-hidroxiestrogênio é inativo e anti-angiogênico. O 4-hidroxiestrogênio têm ação estrogênica maior que a do estradiol e, após glucuronização, pode causar dano ao DNA (Yager, 2000; Travis e Key, 2003).

- 2,3-hidroxiestrogênio e 3,4 hidroxiestrogênio: também produzidos em menor escala pelos complexos CYP1A1 e CYP1A2 (2,3-OHE1/ 2,3-OHE2), CYP1B1 (3,4-OHE1/ 3,4-OHE2) e CYP3A4 (ambos). Estes metabólitos são oxidados pelo complexo P450 e depois conjugados a glutathione-S-transferase (GST). Este processo pode levar a dano ao DNA e os 3,4-OHE1/ E1 podem causar também depurinação (Cavalieri et al., 1997).

- Conjugação: a radicais sulfato, glucuronosil e glutathione, através das enzimas das famílias das sulfotransferases (SULT), glucuronosiltransferases (UGT) e glutathione-S-transferases (GST). Os produtos são compostos hidrossolúveis, eliminados pelos rins. Os genes que transcrevem essas enzimas podem apresentar polimorfismos, produzindo enzimas com atividade modificada e, em teoria, associadas a maior risco para a neoplasia (Liehr, 2000; Linhares et al., 2005) (Figura 2).

Figura 1 – Síntese e degradação de estrogênio (Adaptado de Liehr, 2000).

Figura 2 – Metabolismo do estrogênio pela via de conjugação (Adaptado de Liehr, 2000).

1.2 - Receptor de estrogênio (ER)

A ação do estrogênio nas células ocorre por meio de receptores intracelulares, ESR1 e ESR2 (α e β), que possuem dois diferentes sítios de transcrição: ESR1, localizado no braço longo do cromossomo 6 (6q24-q27), e ESR2, situado no braço longo do cromossomo 14 (14q22-24). Ambos possuem dois sítios de ligação ao estrogênio (AF1 e AF2), sítios para co-fatores e sítio de ligação com o DNA. Quando ativados, dimerizam-se e migram para o núcleo da célula, ligando-se a regiões regulatórias do DNA, ativando a expressão de fatores de transcrição, DNA mitocondrial, a produção de cAMP, TGF α e EDGF e influenciando a expressão de genes responsivos ao estrogênio (Fernandez et al., 2006; Bland e Copeland, 2010).

O ESR1 (α) é dos mais importantes mediadores da resposta hormonal em tecidos estrogênio-sensíveis, como a mama, e tem papel crucial no crescimento e diferenciação do tecido mamário, assim como no desenvolvimento do câncer. É encontrado também no útero e na vagina. É composto por uma seqüência de 595 aminoácidos com domínio central de ligação à molécula de DNA, juntamente com um domínio carboxi-terminal de ligação aos hormônios (Wedrén et al., 2004; Jakimiuk et al., 2007; Hamaguchi et al., 2008).

O ESR2 (β) apresenta homologia ao ER α no domínio de ligação ao DNA, mas apenas 55% de homologia no domínio do ligante. Encontrado no ovário, próstata, testículo, hipotálamo, pulmão e timo. É uma seqüência de 530 aminoácidos (Fernandez et al., 2006).

Os ER, assim como os receptores de progesterona (PR), são fatores prognósticos no CM, sendo também preditivos de resposta à hormonioterapia, com taxas de até 70% de resposta para tumores com ambos receptores positivos (Bland e Copeland, 2010). A associação de polimorfismos nos genes do ER e o risco de doenças, incluindo-se o câncer de mama, tem despertado o interesse dos pesquisadores. Assim, diversas variações na seqüência de DNA dos genes do ER foram descritas (Fernandez et al., 2006; Ivanova et al., 2007; González-Zuloeta et al., 2008; González-Mancha et al., 2008).

1.3 - Genes envolvidos na biossíntese e metabolização do estrogênio

- CYP1A1: o produto do gene CYP1A1 (*cytochrome P450, including family 1, subfamily A, polypeptide 1*) está envolvido no metabolismo do estrogênio por catalizar a hidroxilação do carbono 2, originando o 2-hidroxiestrogênio. Localiza-se no cromossomo 15q22-q24, sendo responsável por codificar a enzima aril hidrocarbono hidroxilase (AHH), que metaboliza hidrocarbonos aromáticos policíclicos a produtos fenólicos e epóxidos, que podem ser carcinogênicos. Foram descritos quatro polimorfismos neste gene, referidos como M1, M2, M3 e M4. O tipo M1, ou gene CYP1A1*2A, tem prevalência de 4,2% entre mulheres afro-americanas; 3,5% na África e 38,3% na China. A substituição de timina por citosina na posição 3801, região não-codificada do gene, relaciona-se a níveis mais elevados de 2-hidroxiestrogênio, o que, em tese, reduziria o risco de desenvolver câncer de mama, visto que o 2-hidroxiestrogênio é inativo (Dunning et al., 1999; Huang et al., 1999; Torresan et al., 2008). No tipo M2, ocorre a substituição de uma adenina por guanina na posição 4889 do éxon 7, levando a substituição de Isoleucina (Leu) pela Valina (Val) no aminoácido 462. Os polimorfismos M1 e M2 parecem estar fortemente relacionados em caucasianos e em asiáticos. No polimorfismo M3 ocorre a criação de um novo sítio de restrição *Msp1* em uma região não codificada do gene, sendo específico de indivíduos africanos. O tipo M4 se localiza na posição 4887, adjacente ao M2. Corresponde a troca de uma citosina por adenina, levando a perda do sítio de restrição *Bsa1* e é traduzido na sequência da proteína

pela troca de treonina por asparagina no códon 461 (Fontana et al., 1998; Huang et al., 1999; Torresan et al., 2008).

- CYP1B1(*Cytochrome P450, including family 1, subfamily B, polypeptide 1*): codifica uma proteína que catalisa a hidroxilação do carbono 4 do estradiol, produzindo o 4-hidroxi-estradiol. Localiza-se no cromossomo 2p21-p22 e apresenta três sítios polimórficos, com trocas dos nucleotídeos 1294G→C (M1), 1347T→C (M2) e 1358A→G. No polimorfismo M1 ocorre substituição de valina por leucina na posição 432 da enzima, ocorrendo em 25% das afro-americanas, 67% das caucasianas e 83% das chinesas. Ocorre maior produção de 4-hidroxiestrogênio, reduzindo a taxa de 2-hidroxiestrogênio/4- hidroxiestrogênio, aumentando o risco de CM. No polimorfismo M2, há substituição de asparagina por serina na posição 453. Tem prevalência de 17,4% em caucasianas; 3,4% em afro-americanas e 29% em européias. Este gera aumento da atividade enzimática, reduzindo os níveis de 2-hidroxiestrogênio e 16- α - hidroxiestrogênio, e aumentando os de 4-hidroxiestrogênio, especialmente após a menopausa, quando, teoricamente, aumentaria o risco de câncer (De Vivo et al., 2002; Rylander-Rudqvist et al., 2003; Schaik, 2005; Torresan et al., 2008).

- CYP3A4 (*Cytochrome P450, including family 3, subfamily A, polypeptide 4*): localizado no cromossomo 7q21.3-q22.1, originalmente chamado conhecido por sua habilidade em metabolizar a nifedipina (nifedipina oxidase). Foram descritos diversos polimorfismos, entre os quais

o mais estudado é o alelo *1B (Galant et al., 2001; Kadlubar et al., 2003). Tal mutação apresenta associação significativa com idade de início da puberdade, independentemente da etnia, logo, correlacionando-se com o início do desenvolvimento mamário e com a idade da menarca, fator de risco implicado na carcinogênese mamária. Sua frequência varia significativamente entre as populações de diferentes raças e etnias (Kadlubar et al., 2003; Hefler et al., 2004).

- COMT: a enzima codificada pelo gene *COMT* (catecol-O-metil transferase) participa da metilação (O-metilação) do 2 e 4-hidroxiestradiol. Localiza-se no cromossomo 2q11.1-q11.2. O polimorfismo origina a variante alélica COMT-L, que é encontrada em 27,4% das mulheres norte-americanas, 25% das caucasianas e 5,2% das chinesas (Dawling et al., 2001; Gaudet et al., 2006; Annerbrinka et al., 2008). A substituição da adenina por guanina, resultando na troca de valina por metionina no códon 158, originando uma enzima com atividade quatro vezes menor. Em consequência, elevam-se os níveis de 2-hidroxiestrogênio, em tese diminuindo o risco do desenvolvimento de CM (Milikan et al., 1998; Dawling et al., 2001).

- UGT1A1: codifica a uridina glucuronil transferase, que catalisa a glucuronidação de bilirrubina indireta em direta. Localizado no cromossomo 2q37. A variante *UGT1A1**28 é originada por uma repetição extra de TA na região promotora do gene TATA-box. A frequência dessa variante é de 13%

na população chinesa. Teoricamente, ocorre diminuição da atividade enzimática e da taxa de inativação de estrogênio, aumentando sua concentração sérica e tecidual (Badhuin et al., 2007). Observou-se que portadoras deste polimorfismo teriam maior densidade do tecido mamário. Sua mutação também foi associada a ocorrência de tumores mais agressivos, com menor taxa de expressão de receptores hormonais (Adegoke et al., 2004; Shatalova et al., 2005).

- ESR1 (*estrogen receptor 1*, também denominado *estrogen receptor alpha* ou *estrogen receptor isoform 1*): codifica o receptor de estrogênio, que é um fator de transcrição ativado por ligantes composto por diversos domínios importantes para a ligação ao hormônio, ao DNA e para ativação de sua transcrição. Os receptores de estrogênio estão envolvidos em diversos processos benignos e malignos, em especial os carcinomas de mama, endométrio e próstata, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares. Dois polimorfismos principais são descritos para o gene *ESR1* (Hamaguchi et al., 2008).

O polimorfismo *PvuII* localiza-se no íntron 1 e corresponde à alteração c454-397citosina-timina. Foi encontrado em 35% das mulheres negras, 13% de caucasianas e 16% de hispânicas (Yaich et al., 1992; González-Mancha et al., 2008). Está relacionado a aumento da ação estrogênica. Consequentemente, seria responsável pela maior densidade mamária na pós-menopausa, menarca e menopausa precoces e melhor resposta a terapia hormonal (Haiman et al., 2003).

O polimorfismo *Xba*I, no íntron 1, consiste na alteração c454-351adenina-guanina e ocorre em 34% da população geral. É relacionado a melhor resposta ao estrogênio, menopausa tardia e maior densidade mamária em vigência terapia hormonal. Existe relação direta entre o número de alelos polimórficos e o risco de carcinoma ductal, sendo esta relação significativa apenas para mulheres acima dos 45 anos. O polimorfismo leva à ativação endógena do receptor, relacionando-se a tumores negativos para ER e mais agressivos. Além disso, pode influenciar a ação do ESR1 sobre a expressão de e-caderina, molécula de adesão que regula a proliferação celular (Jakimiuk et al., 2007).

Experiências *in vitro* e em modelos animais mostraram que os metabólitos do estrogênio realmente podem agir como agentes carcinogênicos (Cavalieri et al., 1997; Coughlin e Piper, 1999). A relevância clínica destas mutações ainda permanece incerta. Embora diversos estudos tenham avaliado o polimorfismo desses genes e sua relação com o câncer de mama, são poucas na literatura as referências sobre análise multigênica na população brasileira, que possui elevados índices de miscigenação. Tais fatos, motivaram-nos a desenvolver a presente pesquisa.

2 - OBJETIVOS

2.1 -. Objetivo Geral

- Avaliar a frequência de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo do estrogênio e de seu receptor em mulheres com câncer de mama.

2.2 – Objetivos Específicos

- Analisar a presença de polimorfismo gênico em *CYP1A1*, *CYP3A4*, *COMT*, *ESR1* e *UGT1A1*;
- Comparar a frequência destes polimorfismos em mulheres com e sem carcinoma mamário.

3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - Seleção das pacientes

O estudo foi constituído por dois grupos de mulheres, sendo o grupo denominado “estudo” formado por 138 mulheres com carcinoma de mama recém-diagnosticado. Adotaram-se os seguintes critérios de inclusão: mulheres sem histórico de neoplasias, a exceção dos cânceres de pele não-melanoma, com idade superior a 40 anos.

Para o outro grupo, denominado “controle”, foram incluídas 121 mulheres. Os critérios de inclusão adotados foram: exames clínico e de imagem da mama normais (categorias BI-RADS 1 ou 2) realizados há, no máximo, 12 meses; ausência de antecedente pessoal de neoplasia, à exceção dos carcinomas de pele não-melanoma; ausência de antecedente pessoal de neoplasia de mama ou ovário, e idade superior a 40 anos.

Estimou-se que esta população seria adequada para se detectar os polimorfismos, com poder de 80% e α de 5%.

3.2 - Entrevistas e coleta de amostras biológicas

Os procedimentos foram realizados na Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo, no Setor de Mastologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e no Departamento de Mastologia do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP (CAPPesq) em 20/05/2009 (parecer número 0433/09 – Anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IBCC em 24/04/2009 (Anexo 2). Após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), as participantes respondiam a um questionário (Anexo 4), contendo dados sobre os antecedentes pessoais, ginecológicos e obstétricos; uso de anticoncepcionais hormonais e de terapia hormonal; e histórico familiar de câncer. Todas foram submetidas a exames físico geral e ginecológico. No grupo de pacientes com carcinoma de mama, foram coletados dados referentes ao tipo, graus histológico e nuclear do tumor, estadiamento clínico e perfil imunoistoquímico (c-erb2, receptores de estrogênio – ER e de progesterona – PR). Em seguida, foi coletada amostra de sangue venoso (4 ml), através de punção de veia periférica de antebraço, para extração de DNA genômico.

3.3 - Execução dos protocolos de biologia molecular

Os protocolos de biologia molecular foram desenvolvidos no Laboratório de Investigações Médicas da Disciplina de Ginecologia (LIM58) do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo (FMUSP) e no Laboratório de Investigações Médicas da Disciplina de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM07) do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP.

3.4 - Extração do DNA genômico

As amostras coletadas foram processadas para separar o plasma dos elementos figurados e armazenado em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA genômico. Os leucócitos polimorfonucleares separados foram utilizados para extração do DNA total das pacientes, utilizando o kit *QIAmp® DNA mini Blood (Qiagen)*, seguindo as instruções do fabricante.

O DNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria em aparelho *NanoDrop (Thermoscientific)* e o perfil de integridade das amostras avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1% impregnado com brometo de etídeo (*Life Biosciences*). Os DNAs foram armazenados em freezer a -20°C para posterior utilização nas reações de sequenciamento e PCR-RFLP.

3.5 - Análise do polimorfismo gênico por PCR-RFLP

Para avaliar o polimorfismo presente nos genes *CYP1A1*, *CYP3A4*, *COMT* e *ESR1* foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

O DNA genômico extraído foi submetido a reação de PCR utilizando os iniciadores descritos na Tabela 1.

- Reagentes: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM DNTP, 0.1 mM de cada primer, 1.5 mM de $MgCl_2$ e 0.4 U de *Taq platinum DNA Polymerase* (Invitrogen).

- Ciclagem: pré-aquecimento a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição específicas para cada um dos polimorfismos (Tabela 1). A análise dos fragmentos foi realizada em gel de agarose a 2% para ESR1 e 3% para os demais genes. As condições de PCR e RFLP foram as já padronizadas para cada gene, descritas na literatura (Lavigne et al., 1997; Huang et al., 1999; Schaik et al., 2000; Boyapati et al., 2005; Baudhuin et al., 2007).

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e as enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo estudado.

Gene/ Amplicon	Iniciadores	Enzimas de Restrição
CYP1A1 (343 bp)	S - 5' TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3' AS - 5' CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT 3'	Msp1
CYP3A4 (334 bp)	S - 5' GGACAGCCATAGAGACAACTGCA 3' AS - 5' CTTTCCTGCCCTGCACAG 3'	PstI
COMT (236 bp)	S - 5' TACTGTGGCTACTCAGCTGTGC 3' AS - 5' GTGAACGTGGTGTGAACACC 3'	Nla III
ER α (1374 bp)	S - 5' CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC 3' AS - 5' TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA 3'	PvuII
ER α (1374 bp)	S - 5' CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC 3' AS - 5' TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA 3'	XbaI

S – Sequência senso. **AS** – Sequência anti-senso.

3.6 - Análise do polimorfismo gênico de UGT1A1*28 por sequenciamento

Devido a problemas com o fornecimento de reagentes, duas técnicas foram usadas para a pesquisa da alteração UGT1A1*28: análise de fragmentos e sequenciamento. Ambos protocolos são descritos em detalhes no artigo de Baudhuin et al. (2007), e sua eficácia é comparada. Foi obtida uma concordância entre os resultados, de modo que essa intercorrência não prejudica a qualidade da análise. Nas técnicas de genotipagem por análise de fragmento foram utilizados controles da reação, de modo a assegurar a fidelidade dos resultados.

Para o sequenciamento, foi usado o *kit Big Dye Terminator Mix v3.2*, utilizando o sequenciador automático ABI377 (Applied Biosystem, Foster City, EUA). Cada reação envolveu 40 ng a 80 ng de fragmento de PCR purificado; 2,5 pmol de *primer* UGT1A1 Direto e Reverso, 6 µL de tampão de sequenciamento, 4 µL de *Big Dye terminator* e água *MilliQ* estéril em quantidade suficiente para 20 µL. As reações foram realizadas em termociclador, usando os seguintes parâmetros: 25 ciclos compostos por 20 seg. a 95°C, 25 seg. a 50°C e 1 minuto a 60°C. As sequências obtidas foram comparadas e analisadas com o programa *Bioedit Sequence Aligment Editor and Codoncode* (Codoncode Corporation).

A análise de fragmentos foi feita a partir da corrida eletroforética em capilar MegaBace 1000 (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), de um PCR realizado com um *primer* marcado com fluoróforo. Para análise

de fragmentos, foi utilizado o *primer* UGT direto: 5' GAG GTT CTG GAA GTA CTT TGC 3' marcado com o fluoróforo FAM e *primer* UGT1A1 reverso: 5' CCA AGC ATG CTC AGC CAG 3' (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A placa de análise de fragmento usou 7,75 µL de Tween 20 a 0,1% (v/v); 0,25 µL de ET Rox 900; e 1,5 µL de produto do PCR.

Os resultados foram analisados no programa de computador *Fragment Profiler* (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Os fragmentos variaram em um intervalo de 403 a 403.9 pb para o genótipo TA6/6, 403 a 405.3 pb para o genótipo TA6/7 e 404.2 a 406.9 pb para o genótipo TA7/7.

3.7 - Método estatístico

As informações obtidas nas entrevistas foram codificadas e digitadas em uma planilha de dados. Dados incompletos (missing data) foram manejados de 2 formas: no caso de variáveis com menos de 10% de dados incompletos, estes foram substituídos pela média dos valores para todas as pacientes (mean imputation); variáveis com mais de 10% de dados incompletos não sofreram substituição e apenas os dados disponíveis foram analisados (completer only analysis).

As variáveis categóricas foram descritas como proporções e comparadas pelos testes Chi-quadrado e exato de Fisher. As variáveis contínuas foram testadas para normalidade usando a análise visual dos histogramas de distribuição dos dados e o teste de Shapiro-Wilk. Variáveis

com distribuição normal foram descritas como médias e desvio-padrão e comparadas pelo teste t de Student para dados não-pareados; variáveis com distribuição não-normal foram descritas como medianas e intervalos interquartil e comparadas pelo teste Wilcoxon rank-sum.

Após a análise dos dados completos, notou-se grande heterogeneidade entre os grupos “casos” e “controles”, sobretudo na variável idade. Para a avaliação de fatores de risco para câncer de mama, optou-se por pareamento de dados: cada caso foi pareado com 1 ou 2 controles com diferença máxima de idade de 3 anos. Como, após o pareamento, a única diferença entre os grupos eram os polimorfismos testados, não foi necessária uma análise multivariada.

Para os polimorfismos, foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg através da ferramenta online disponível em <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> e consideraram-se estatisticamente significantes valores de $p \leq 0,05$.

O programa de computador Stata 11.1 IC (Stata Corp., College Station, EUA) foi utilizado nas demais análises estatísticas. Visando corrigir o erro tipo I decorrente de comparações múltiplas, os valores calculados para o p foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,01$.

4 – RESULTADOS

4.1 - Dados Epidemiológicos

Durante o período do estudo, foram incluídas 138 mulheres no grupo estudo e 121 no grupo controle. Características clínicas e epidemiológicas dos dois grupos estão descritas na tabela 2.

O grupo estudo apresentou média de idade superior ao grupo controle (56,5 vs. 46, $p<0,001$), porém as idades de menarca (13,27 vs. 12,89, $p=0,09$), menopausa (48 vs. 49, $p=0,63$) e o tempo em menacme em anos (34 vs. 33, $p=0,36$) foram semelhantes nos dois grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa. A média do número de gestações foi o mesmo nos grupos (2 gestações, $p=0,03$) e os valores de IMC também não apresentaram diferença significativa (27,7 vs. 27,1, $p=0,48$).

Quanto ao uso de contraceptivos orais, observou-se que 48,5% das mulheres do grupo estudo utilizaram e 61,3% dos controles ($p=0,4$). Já a terapia hormonal foi utilizada por 19,7% do grupo estudo e 40,9% dos controles ($p=0,013$). 83% das participantes tiveram alguma gestação a termo, correspondendo a 88,1% dos casos e 77,3% dos controles ($p=0,022$).

Com relação a etnia, no grupo estudo a distribuição de brancas, pardas, negras e amarelas foi 53,6%, 31,1%, 10,9% e 4,3% e no grupo controle foi 42,9%, 36,3%, 20,6% e 0, respectivamente.

Tabela 2 – Características gerais da amostra.

Variável	Total	Casos	Controles	p
	259	138	121	
Idade (mediana)	51 (45-61)	56,5 (49-67)	46 (44-51)	<0,001
Menarca (média, DP)	13,1 (1,8)	13,27 (1,8)	12,89 (1,8)	0,09
Menopausa				
%	55%	75,36231884	32,23140496	<0,001
Mediana	48 (43-50)	48 (43-51)	49(42-50)	0,63
Menacme (mediana)	33 (30-37)	34 (30-37)	33 (30-36)	0,36
Uso de ACO (%)	54,50%	48,55072464	61,34453782	0,4
Uso de TRH (%)	26,70%	19,68503937	40,90909091	0,013
Paridade				
%	83%	88,14814815	77,31092437	0,022
Gestações a termo (mediana)	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	0,03
Etnia				0,01
Branca	48,60%	53,62318841	42,97520661	
Parda	33,60%	31,15942029	36,36363636	
Negra	15,50%	10,86956522	20,66115702	
Amarela	2,30%	4,347826087	0	
IMC				
>30 (%)	28,80%	30,90909091	26,60550459	0,48
Mediana	27,5 (24,4-30,5)	27,7 (23,9-31,2)	27,1 (24,5=30,0)	0,9

4.2 - Genotipagem

O processo de extração de DNA gerou quantidades satisfatórias para todas as amostras. Da análise de UGT1A1*28, dentre as amostras avaliadas por análise de fragmentos, 88% geraram resultados satisfatórios e o restante foi submetido a sequenciamento. Das amostras sequenciadas, 8 delas (15%) precisaram ser repetidas.

Os resultados das genotipagens estão descritos na tabela 3. A distribuição dos genótipos de UGT1A1*28, CYP1A1 MspI, CYP3A4*1B,

ESR1 PvuII e ESR1 XbaI não apresentou diferença estatisticamente significativa entre casos de câncer de mama e controles. Já para COMT, o genótipo L/L, foi mais frequente no grupo controle, com $p \leq 0,01$.

Tabela 3 – Resultados das genotipagens em UGT1A1, CYP1A1, COMT, PvuII, XbaI e CYP3A4.

Gene	Casos	Controles	p
UGT1A1			
.6/.6	37,34939759	38,55421687	
.6/.7	45,78313253	50,60240964	
.7/.7	16,86746988	10,84337349	0,52
Genótipo de risco	16,86746988	10,84337349	0,26
CYP1A1			
Wild	68,57142857	64,17910448	
Heterozigoto	30	22,3880597	
Homozigoto	1,428571429	13,43283582	0,02
Genótipo de risco	31,42857143	35,82089552	0,58
COMT			
HH	86,95652174	57,97101449	
HL	4,347826087	13,04347826	
LL	8,695652174	28,98550725	0,001
Genótipo de risco	8,695652174	28,98550725	0,002
PvuII			
wild	15,78947368	20,40816327	
heterozigoto	44,73684211	147000	
homozigoto	39,47368421	18,36734694	0,092
Genótipo de risco	39,47368421	18,36734694	0,03
XbaI			
wild	38,46153846	28,57142857	
heterozigoto	41,02564103	65,30612245	
homozigoto	20,51282051	6,12244898	0,037
Genótipo de risco	61,53846154	71,42857143	0,33
CYP3A4			
Wild	63,04347826	52,17391304	
Heterozigoto	36,95652174	47,82608696	0,29
Genótipo de risco	36,95652174	47,82608696	0,29

Quando avaliadas somente as pacientes do grupo estudo, separadas em subgrupos pré- e pós-menopausa, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos avaliados para nenhum dos genes pesquisados (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise genotípica do grupo estudo para UGT1A1, CYP1A1, COMT, PvuII, XbaI e CYP3A4.

Gene	Pré-menopausa	Pós-menopausa	p
Total	33	105	
UGT1A1			
.6/.6	36,36363636	41,9047619	
.6/.7	45,45454545	41,9047619	
.7/.7	18,18181818	16,19047619	0,85
Genótipo de risco	18,18181818	16,19047619	0,85
CYP1A1			
Wild	66,66666667	68,6746988	
Heterozigoto	33,33333333	27,71084337	
Homozigoto	0	3,614457831	0,55
Genótipo de risco	33,33333333	31,3253012	0,84
COMT			
HH	81,48148148	80,48780488	
HL	3,703703704	10,97560976	
LL	14,81481481	8,536585366	0,37
Genótipo de risco	14,81481481	8,536585366	0,35
PvuII			
Wild	9,090909091	17,64705882	
Heterozigoto	36,36363636	47,05882353	
Homozigoto	54,54545455	35,29411765	0,5
Genótipo de risco	54,54545455	35,29411765	0,26
XbaI			
Wild	25	42,42424242	
Heterozigoto	50	42,42424242	
Homozigoto	25	15,15151515	0,52
Genótipo de risco	75	57,57575758	0,29
CYP3A4			
Wild	77,77777778	55,76923077	
Heterozigoto	22,22222222	44,23076923	0,1
Genótipo de risco	22,22222222	44,23076923	0,1

As figuras 3 a 6 mostram as reações de PCR-RFLP para CYP1A1, COMT, CYP3A4 e ESR1. O sequenciamento realizado para UGT1A1 pode ser visto na figura 7.

Figura 3 – Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para CYP1A1 com *MspI*, em gel de agarose a 2%. As amostras exibindo somente a banda de 340 bp são indivíduos homozigotos selvagens. As colunas 6 e 10 mostram as bandas de 200 e 140 bp, caracterizando indivíduos homozigóticos para a mutação. Quando exibidas todas as bandas, trata-se de padrão heterozigótico. P = padrão de peso molecular.

Figura 4 – Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para COMT, em gel de agarose a 2%. As amostras exibindo as bandas de 114, 54 e 42 bp são indivíduos homozigotos para enzima de alta atividade (H/H). Quando mostradas as bandas de 96, 54 e 42 bp, trata-se de mutação homozigótica da enzima de baixa atividade (L/L). Quando exibidas todas as bandas, trata-se de perfil heterozigoto (H/L).

Figura 5 – Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para CYP3A4, em gel de agarose a 2%. As amostras exibindo as bandas de 220 bp representam perfil homozigótico não mutado (selvagem); quando mostradas as bandas de 199 bp, trata-se de mutação homozigótica. O perfil do indivíduo heterozigótico exibe ambas as bandas.

Figura 6 – Fragmento de DNA amplificado por PCR-RFLP para ESR1, em gel de agarose a 3%. O perfil homozigoto dominante não mutado para XbaI e PvuII (XX/PP) é representado pela banda de 1300 bp; Xx pelas bandas 1300, 900 e 400 bp; Pp 1300, 800 e 500 bp. O indivíduo mutado (homozigoto recessivo) exibe as bandas de 900 e 400 bp para xx e 800 e 500 bp para pp.

Figura 7 – Sequenciamento de UGT1A1. Notam-se os genótipos mutado (TA 7/7 – UGT1A1*28), selvagem (TA 6/6) e heterozigoto (TA 6/7).

5 – DISCUSSÃO

Os estudos sobre a patogênese do carcinoma mamário encontram-se atualmente direcionados ao conhecimento de aspectos moleculares da doença. Evidências sugerem que variações genéticas individuais, definidas por polimorfismos genéticos, poderiam atuar como fator de risco importante para determinadas afecções (Key e Verkasalo, 1999).

O câncer de mama é resultante de complexa interação entre diversos genes e fatores ambientais. Assim, genes atuando em várias combinações poderiam influenciar a susceptibilidade individual à doença. Diversos genes têm sido implicados como participantes no desenvolvimento do câncer de mama; dentre eles ressaltam aqueles relacionados ao metabolismo do estrogênio e na atuação de seu receptor (Le Marchand et al., 2005).

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama é a exposição a grandes quantidades de estrogênio endógeno e exógeno ao longo da vida. Diversos fatores associados a esse risco aumentado estão ligados ao estrogênio endógeno, tais como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade e obesidade após a menopausa (Yager, 2000; Thompson et al., 2000).

O estrogênio está envolvido na gênese de uma grande variedade de doenças além do câncer de mama, como endometriose, doença de Alzheimer, hipertensão arterial crônica, osteoporose, aterosclerose e carcinomas de cólon e próstata (Yager, 2000; Liehr, 2000).

As mutações podem levar à perda completa da expressão do gene ou à formação de uma proteína variante com propriedades alteradas. Polimorfismos relacionados ao risco de carcinoma mamário foram identificados em genes envolvidos em grande variedade de funções, por exemplo no metabolismo de hormônios esteroides, controle do ciclo celular, reparo do DNA e metabolização de carcinógenos ambientais (Modugno et al., 2003, Yager e Davidson, 2006).

Mutações genéticas podem aumentar a incidência de diversas doenças, dentre elas as neoplasias; por alterarem a expressão gênica seriam relevantes na oncogênese. Como o estrogênio é importante na carcinogênese mamária e na predição de resposta terapêutica (através do estado dos receptores hormonais tumorais), polimorfismos de genes que atuam na biossíntese, degradação e em seu receptor têm sido estudados. Acredita-se que polimorfismos nestes genes, afetando a síntese e a degradação do estrogênio, bem como a função do seu receptor, poderiam influenciar o desenvolvimento do câncer de mama. Assim, poderia ser um novo fator de risco para a doença (Schaik, 2005; Pharoah et al., 2006).

Grande parte dos estudos sobre a relação entre os polimorfismos genéticos ligados ao estrogênio e o carcinoma mamário foi realizada em mulheres asiáticas. A população brasileira, com alto índice de miscigenação, poderia ter perfil de genotipagem diferente, mesmo se comparada a estudos feitos em caucasianas (Santos, 2007; Dufloth et al., 2008).

As enzimas do complexo CYP são de suma importância na produção, biodisponibilidade e degradação do estrogênio. Vários polimorfismos e

mutações nesse complexo enzimático foram identificados, alguns alterando a expressão gênica, outros causando alteração conformacional no produto do gene. Polimorfismos e mutações que levem a consequências biológicas funcionalmente relevantes são capazes de influenciar o curso clínico das doenças (Schaik, 2005).

Acredita-se que a enzima do citocromo P450 1A1 seja uma das principais enzimas de fase I expressa no tecido mamário. Está envolvida na hidroxilação do 17 β -estradiol em 2-hidroxiestradiol e na metabolização de carcinógenos, como as aminas heterocíclicas, por exemplo. No polimorfismo avaliado neste estudo, M1 ou Mspl, ocorre a substituição de timina por citosina na posição 3801 (T3801C), aumentando a produção de 2-hidroxiestrogênio, um composto inativo, o que em tese, reduziria o risco de desenvolvimento de câncer de mama (Taioli et al., 1995; Fontana et al., 1998; Wang et al., 2011).

Nossos resultados não mostraram diferença significativa dos genótipos nos grupos de mulheres com e sem carcinoma mamário. Se este polimorfismo estiver implicado como fator protetor ao desenvolvimento da doença, poder-se-ia esperar maior frequência da mutação em indivíduos do grupo controle (Wang et al., 2011), o que ocorreu em nosso estudo, porém sem atingir significância estatística.

Segundo Huang et al. (1999), a frequência do genótipo mutado varia acentuadamente entre os diferentes grupos étnicos, sendo muito mais comum em asiáticas do que nas caucasianas (13% vs. 1%). Este mesmo grupo de autores encontrou associação positiva do genótipo mutado com o

câncer de mama. Outros autores, no entanto, não confirmaram essa associação, por vezes encontrando relação não significativa estatisticamente (Taioli et al., 1995; Lavigne et al., 1997; Fontana et al., 1998; Wang et al., 2011).

A transição guanina→adenina no códon 158 do gene COMT gera a troca de valina por metionina, diminuindo a atividade enzimática, o que poderia aumentar o risco para o câncer de mama devido ao acúmulo de catecolestrogênio. Em nossa casuística, o genótipo mutado homozigoto (L/L) foi significativamente mais frequente nas mulheres do grupo controle (sem câncer). Se observarmos estudos acerca desta mutação, não há consenso quanto à influência do genótipo L/L no risco de carcinoma mamário. Algumas referências mostram associação com risco de câncer de mama na pós-menopausa e outras diminuição de risco na pré-menopausa (Dawling et al., 2001; Annerbrinka et al., 2008; He et al., 2012). A interação do metabolismo estrogênico e o índice de gordura corporal pode explicar as diferenças nos achados em mulheres na pré e pós-menopausa. Millikan et al. (1998) não encontraram associação do genótipo L/L com o câncer de mama. Os resultados não foram influenciados pelo estado menopáusico, raça ou IMC. O encontro do genótipo L/L em maior frequência nas mulheres de nosso grupo controle nos leva a supor que, em nossa população, este genótipo possa ser um fator protetor para o carcinoma de mama. Talvez, em mulheres brasileiras, a COMT favoreça mais a formação de 2-catecolestrogênio do que a de 4-catecolestrogênio. Como o 2-

catecolestrogênio é inativo, seu acúmulo não proporcionaria aumento do risco da doença.

Foram descritas diversas associações entre o polimorfismo CYP3A4*1B e o desenvolvimento de neoplasias, em especial próstata e carcinoma pulmonar de pequenas células, possivelmente também com as leucemias na infância (Kolars et al., 1994; Guengerich, 1999; Nogal, 2008). A possível relação entre CYP3A4*1B e o câncer de mama foi sugerida por Kadlubar et al. (2003), devido à associação positiva com a idade da menarca e por esta ser um fator de risco conhecido para o desenvolvimento da doença. Em nossa avaliação, não houve maior frequência do genótipo de risco no grupo estudo.

As portadoras do polimorfismo UGT1A1*28 apresentam redução da atividade enzimática de 80%, o que prejudica a metabolização dos catecolestrogênios (Adegoke et al., 2004). Pode-se que concluir que, devido ao acúmulo de catecolestrogênios, haveria maior susceptibilidade ao câncer de mama. Huo et al. demonstraram que o efeito do polimorfismo era mais importante em mulheres na pré-menopausa, enquanto Cheng et al. (2005) encontraram uma associação mais forte em nulíparas. Adegoke et al. (2004), no entanto, demonstraram que o polimorfismo só se associou a neoplasias em mulheres jovens, com IMC normal, menarca tardia e com período de menacme menor que 30 anos. Não observamos, em nosso estudo, diferença significativa entre os grupos avaliados quanto a este polimorfismo.

Os receptores de estrogênio estão envolvidos em diversos processos patológicos, benignos e malignos. Além disso, associam-se à predição de

resposta a hormonioterapia adjuvante no carcinoma de mama e a melhor prognóstico da doença, quando expressos (Bland e Copeland, 2010). Os polimorfismos PvuII e XbaI do gene ESR1 alteram a função dos RE, podendo modificar o risco para o câncer de mama (Ramos, 2009). Em nossa casuística, não observamos maior frequência destes polimorfismos nas pacientes com câncer. Ramos (2009) associou os alelos mutados homozigotos a mamas mais densas à mamografia. Por ser o tecido fibroglandular o local de desenvolvimento da doença, sugeriram haver maior risco. Shin et al. (2003) relacionaram o genótipo XX de XbaI a menarca tardia, o que poderia vir a ser um fator protetor. Contudo, esta suposição não foi confirmada em outros estudos; os resultados são conflitantes, e os mecanismos moleculares pelos quais os polimorfismos influenciam a atividade do receptor ainda não estão totalmente esclarecidos (Wedrén et al., 2004; Dumas e Diorio, 2011).

Portanto, baseado nos resultados de nosso estudo, é importante direcionar pesquisas futuras para a identificação de fatores genéticos e ambientais, em diferentes populações e com grande número de indivíduos, na tentativa de determinar quais polimorfismos realmente apresentam impacto no aumento de risco para o câncer de mama.

6 - CONCLUSÕES

- A frequência de polimorfismos em UGT1A1*28 e ESR1 PvuII foi de 16,8% e 39,4% nas mulheres com câncer de mama e 10,8% e 18,3% nas sem câncer.

- A frequência de mutações em ESR1 XbaI, CYP3A4*1B e CYP1A1 MspI foi de 15,1, 44,2 e 3,6% nas mulheres sem câncer de mama e de 25, 22,2% e 0 nas com câncer de mama.

- O genótipo L/L do gene COMT foi significativamente mais frequente no grupo controle (28,9 vs. 8,6%), sugerindo que este polimorfismo poderia ser um fator protetor ao câncer de mama na população estudada.

7 - ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A 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 sessão de 20/05/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0433/09**, intitulado: "**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO E EM RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM MULHERES SADIAS E EM PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO**", apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **DR. EDMUND CHADA BARACAT**
Pesquisador (a) Executante: **ALICE APARECIDA RODRIGUES FERREIRA FRANCISCO**

CAPPesq, 20 de Maio de 2009

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 e da FMUSP 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 / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do IBCC.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER
Sociedade Beneficente São Camilo
 Centro de Estudos "Prof. Dr. João Sampaio Góes Júnior."

São Paulo, 30 de abril de 2009.

Pesquisadora: **Dra. Alice Aparecida Rodrigues Ferreira Francisco**

Ref.: Projeto de Pesquisa "Análise de Polimorfismos de Genes Envolvidos no Metabolismo e em Receptores de Estrogênio em Mulheres Sadias e em Portadoras de Carcinoma Mamário".

Vimos informar que sua solicitação para execução do projeto de pesquisa supracitado foi analisada e **aprovada** pela Comissão de Trabalhos Científicos – CTC do IBCC em **24/04/2009**.

Fica estabelecido que o pesquisador responsável deve se comprometer pelo bom andamento dessa pesquisa quanto a:

1. Cumprir as determinações impostas pela CTC em Orientações Gerais, formulário recebido na inscrição do Projeto.
2. Veracidade dos dados obtidos e a qualidade técnica.
3. Conclusão do estudo.
4. Fornecimento de relatórios trimestrais a CTC (Informar data de início e de término).
5. Utilização do material apenas para o fim especificado no projeto aprovado.
6. Arcar com qualquer **despesa** referente à execução do trabalho.
7. Incluir o nome do IBCC em qualquer publicação ou apresentação de resultados em eventos científicos especificando que o trabalho foi realizado na Instituição.
8. No trabalho deverão constar referências bibliográficas de autores do IBCC caso haja publicações na área.
9. Incluir o nome do Diretor Técnico Científico do IBCC, Profº. Dr. João Carlos Guedes Sampaio Góes como co-autor do trabalho, sendo citado no final da relação de autores como representante da instituição.
10. Enviar cópia do trabalho quando apresentado / publicado para o CEJSG – Coordenadoria de Pesquisa.

Atenciosamente,

Dra. Célia Tosello de Oliveira
 Coordenadora de Pesquisa do CEJSG

Ciente: Alice Francisco

Data: 06/07/09

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ NASCIMENTO: ____/____/____
ENDEREÇO _____ Nº _____
BAIRRO: _____ CIDADE _____
CEP: _____ TELEFONE: (____) _____
2. RESPONSÁVEL LEGAL _____
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : _____ SEXO: M ☐ F ☐
NASCIMENTO: ____/____/____
ENDEREÇO _____ Nº _____
BAIRRO: _____ CIDADE _____
CEP: _____ TELEFONE: (____) _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO E EM RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM MULHERES SADIA E EM PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO”.

1. PESQUISADOR : Prof. Dr. Edmund Chada Baracat
CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular da Universidade de São Paulo.
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº : 28085
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
2. AValiação do RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR
3. DURAÇÃO DA PESQUISA : Aproximadamente 12 meses

- 1 – O câncer de mama é um dos tipos mais comuns de câncer em mulheres, não é contagioso e uma das suas principais causas é a exposição a elevados níveis de estrogênios durante um longo período de tempo. Os estrogênios são os principais hormônios femininos e há variações de pessoa a pessoa na forma como eles são produzidos e como atuam no corpo. Essas variações dependem de diferenças nos genes de cada um, que recebem o nome de polimorfismos. Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa estabelecer uma correlação entre o perfil genético de mulheres saudáveis e das pacientes em tratamento de câncer de mama.
- 2 – Para a realização da pesquisa será feita uma coleta de sangue. O objetivo de tal procedimento é analisar o DNA das pacientes e identificar os polimorfismos importantes para esta pesquisa.
- 3 – A coleta de sangue será realizada por meio de punção de veia periférica, de maneira semelhante a um exame de sangue de rotina.
- 4 – A coleta de sangue, desde que feita por profissionais treinados e com material adequado, apresenta riscos mínimos à saúde do paciente. Porém, ela pode causar algum desconforto local que varia de pessoa para pessoa.
- 5 – Este é um estudo observacional, ou seja, ele não influenciará no tratamento das pacientes que concordarem em participar dele. Porém, espera-se que ele ajude no tratamento futuro de pacientes com câncer de mama, melhorando sua qualidade de vida e sua resposta ao tratamento.
- 6 – Existem diversas modalidades de tratamento para o câncer de mama e cada paciente deve discutir com o seu médico a melhor opção para o seu caso. A participação, ou não, neste estudo não influenciará nessa decisão.
- 7 – Qualquer pergunta, dúvida ou esclarecimento sobre a pesquisa poderá ser feita, em qualquer etapa do projeto, à Dra. **Alice Aparecida Rodrigues Ferreira Francisco** (tel: 8384-5258), que pode ser encontrada no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, Av. Alcântara Machado, 2576 – Moóca – São Paulo, ou ao acadêmico **Diogo Bugano Diniz Gomes** (tel: 9900-0608), que pode ser encontrado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 – Cerqueira César – São Paulo. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br.
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- 9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – Cada paciente tem o direito de saber, ao final do estudo, os resultados de seus testes. Para tanto, deve entrar em contato com os pesquisadores. É importante ressaltar que se trata de projeto experimental e o uso de seus resultados para a tomada de decisões clínicas deve ser feito com cautela, sempre com a participação do médico responsável pelo caso.

11 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13 – Há o compromisso do pesquisador em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO E EM RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM MULHERES SADIA E EM PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO". 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.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Anexo 4 – Questionário clínico.

Dados Clínicos e Epidemiológicos

Controle nº _____

Nome: _____

Data: _____ / _____ / _____

Idade: _____

Registro: _____

Nascimento: _____

Escolaridade: _____

Estado civil: _____

Raça: _____

Raça: ☐ Branca☐ Parda☐ Negra☐ Asiática**Ant. Ginecológico***Menarca:* _____*Ciclos* _____

() regulares

() irregulares

Paridade _____

1º parto: _____

Amamentação _____

() sim

() não

Menopausa: _____

DUM _____

Último parto: _____

Quanto tempo (total em meses): _____

Anticoncepcional _____

() sim

() não

Quanto tempo: _____

Rep. hormonal _____

() sim

() não

() resposta total

() resposta par.

Quanto tempo: _____

Hábitos e vícios

() Tabagismo

() Etilismo

() Drogas – quais? _____

Ant. Pessoal

() diabetes

() cardiopatia

() outras neo.

() Ca ovário

Ant. Familiar

() diabetes

() cardiopatia

() outras neo.

() ca de mama

Quantos? _____

Idades: _____

Bilateral? _____

() ca de ovário

Quantos? _____

Idades: _____

Dados clínicos**Queixas**

() Nódulo

() Trauma

() Dor

() Fluxo papilar

() Inflamação

() Outros

() Assintomática

Exame clínico

8 – REFERÊNCIAS

Adams SA, Matthews CE, Hebert JR, Moore CG, Cunningham JE, Shu XO, Fulton J, Gao Y, Zheng W. Association of physical activity with hormone receptor status: The Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(6):1170-1178.

Adegoke OJ, Shu XO, Gao YT, Cai Q, Breyer J, Smith J, Zheng W. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 85(3): 239-245.

Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira AC, Bandelt HT, Pena SD, Prado VF. The ancestry of brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; 67(2): 444-461.

Annerbrinka K, Westberg L, Nilsson S, Rosmond R, Holm G, Eriksson E. Catechol O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Metabolism* 2008; 57(5): 708-711.

Barros ACSD. Genética e epigenética: bases moleculares da formação inicial do câncer de mama. *Rev Bras Mastologia* 2010; 20:48-54.

Barros ACSD. Genética, biologia molecular e carcinogênese mamária. *Rev Bras Mastologia* 2006; 4:170-175.

Baudhuin LM, Highsmith WE, Skierka J, Holtegaard L, Moore BE, O'Kane DJ. Comparison of three methods for genotyping the UGT1A1 (TA)_n repeat polymorphism. *Clin Biochem* 2007 Jun;40(9-10):710-7.

Bland KI, Copeland EM. The Breast – Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases. 4th edition, Saunders Editor, 2010.

Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Smith JR, Wen W, Gao YT, Zheng w. Polymorphisms in ER- α gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3):1093-1098.

Bugano DD, Conforti-Froes N, Yamaguchi NH, Baracat EC. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008; 29(4):313-20.

Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, Johansson SL, Patil KD, Gross ML, Gooden JK, Ramanathan R, Cerny RL, Rogan EG. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94(20):10937-10942.

Cheng TC, Chen ST, Huang CS, Fu YP, Yu JC, Cheng CW, Wu PE, Shen CY. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the catechol estrogen-metabolizing genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2005; 113(3):345-353.

Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344(4): 276-85.

Coughlin SS, Piper M. Genetic polymorphisms and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8(11):1023-1032.

Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, Wang X, Parl FF. Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res* 2001; 61(18):6716-6722.

De Vivo I, Hankinson SE, Li L, Colditz GA, Hunter DJ. Association of CYP1B1 polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(5):489-492.

Dufloth RM, Arruda A, Heinrich JKR, Schmitt F, Zeferino LC. The investigation of DNA repair polymorphisms with histopathological characteristics and hormone receptors in a group of Brazilian women with breast cancer. *Genet Mol Res* 2008; 7(3):574-582.

Dumas I, Diorio C. Estrogen pathway polymorphisms and mammographic density. *Anticancer Res* 2011; 31(12):4369-4386.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8(10):843-854.

Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, et al. Tumours of the Breast. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. *Pathology & Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003. p. 9-112.

Fernandez LP, Milde RL, Barroso E, Cuadros M, Arias JI, Ruibal A, Benítez J, Ribas G. Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study. *Int J Cancer* 2006; 119(2):467-471.

Fontana X, Peyrottes I, Rossi C, Leblanc-Talent P, Ettore F, Namer M et al. Study of frequencies of CYP1A1 gene polymorphisms and glutathione S-transferase mu1 gene in primary breast cancers: an update with an additional 114 cases. *Mutat Res* 1998; 403(1-2):45-53.

Freitas NMA, Freitas Junior R, Curado MP, Martins E, Silva CMB, Moreira MAR, Biazus JA. Tendência da incidência e mortalidade do câncer de mama

em Goiânia: análise de 15 anos (1988-2002). *Rev Bras Mastologia* 2006; 16(1):17-21.

Galant C, Gala JL, Van Den Berge V, Berlière M, Haumont E, Horsmans Y. Immunolocalization of cytochrome P-450 3A enzymes in human breast carcinoma: relationship with tumour differentiation and steroid receptors. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88(3):142-146.

Gaudet MM, Chanock S, Lissowska J, Berndt SI, Peplonska B, Brinton LA, Welch R, Yeager M, Bardin-Mikolajczak A, Garcia-Closas M. Comprehensive Assessment of Genetic Variation of Catechol-O-Methyltransferase and Breast Cancer Risk. *Cancer Res* 2006; 66(19):9781-9785.

González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, Pérez LI, González-Perez A, Morón FJ, Moreno Nogueira JA, Real LM, Pascual MH, Ruiz A, Royo JL. Analysis of the ERalpha germline PvuII marker in breast cancer risk. *Med Sci Monit* 2008; 14(3):CR136-143.

González-Zuloeta Ladd AM, Vásquez AA, Rivadeneira F, Siemes C, Hofman A, Stricker BH, Pols HA, Uitterlinden AG, van Duijn CM. Estrogen receptor α polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107(3):415-419.

Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:1-17.

Haiman CA, Hankinson SE, De Vivo I, Guillemette C, Ishibe N, Hunter DJ, Byrne C. Polymorphisms in steroid hormone pathway genes and mammographic density. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77(1):27-36.

Hamaguchi M, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Fujii Y, Yamashita H. Possible difference in frequencies of genetic polymorphisms of estrogen

receptor α , estrogen metabolism and p53 genes between estrogen receptor-positive and -negative breast cancers. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38(11):734-742.

Han W, Kang D, Park IA, Kim SW, Bae JY, Chung KW, Noh DY. Associations between Breast Cancer Susceptibility Gene Polymorphisms and Clinicopathological Features. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1Pt1):124-130.

Hefler LA, Tempfer CB, Grimm C, Lebrecht A, Ulbrich E, Heinze G, Leodolter S, Schneeberger C, Mueller MW, Muendlein A, Koelbl H. Estrogen-Metabolizing Gene Polymorphisms in the Assessment of Breast Carcinoma Risk and Fibroadenoma Risk in Caucasian Women. *Cancer* 2004; 101(2):264-9.

Huang CS, Chern HD, Chang KJ, Cheng CW, Hsu SM, Shen CY. Breast Cancer Risk Associated with Genotype Polymorphism of the Estrogen-metabolizing Genes *CYP17*, *CYP1A1*, and *COMT*: A Multigenic Study on Cancer Susceptibility. *Cancer Res* 1999; 59(19):4870–4875.

Instituto Nacional do Câncer, 2012. Estimativa da Incidência da Mortalidade por Câncer de Mama no Brasil 2012. www.inca.gov.br.

Ivanova JT, Doukova PB, Boyanov MA, Popivanov PR. PvuII and XbaI polymorphisms of the estrogen receptor gene and bone mineral density in a Bulgarian population sample. *Hormones (Athens)* 2007; 6(1):36-43.

Jakimiuk AJ, Nowicka MG, Bogusiewicz M, Adamiak A, Skorupski P, Miotla P, Rechberger T, Haczynski J. Prevalence of estrogen receptor PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45(4):331-338.

Kadlubar FF, Berkowitz GS, DeLongchamp RR, Wang C, Green BL, Tang G, Lamba J, Schuetz E, Wolff MS. The CYP3A4*1B Variant Is Related to the Onset of Puberty, A Known Risk Factor for the Development of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 327-331.

Key TJ, Verkasalo PK. Endogenous hormones and the aetiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 1999; 1(1): 18-21.

Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 1994; 4(5):247–59.

Lavigne JA, Helzlsouer KJ, Huang HY, Strickland PT, Bell DA, Seimin O, Watson MA, Hoffman S, Comstock GW, Yager JD. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57(24):5493-5497.

Le Marchand L, Donlon T, Kolonel LN, Henderson BE, Wilkens LR. Estrogen metabolism–related genes and breast cancer risk: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(8):1998-2003.

Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000; 21:40-54.

Linhares JJ, Da Silva ID, De Souza NC, Noronha EC, Ferraro O, de Carvalho CV, Baracat EC, Baracat FF. Genetic polymorphism of GSTM1 in women with breast cancer and interact with reproductive history and several clinical pathologies. *Biol Res* 2005; 38(2-3):273-281.

Millikan RC, Pittman GS, Tse CKJ, Duell E, Newman B, Savitz D, Moorman PG, Boissy RJ, Bell DA. Catechol-O-methyltransferase and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 1998; 19(11):1943-1947.

Modugno F, Knoll C, Kanbour-Shakir A, Romkes M. A potential role for the estrogen-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82:191-197.

Murabito JM, Rosenberg CL, Finger D, Kreger BE, Levy D, Splansky GL, Antman K, Hwang SJ. A genome-wide association study of breast and prostate cancer in the NHLBI's Framingham Heart Study. *BMC Med Genet* 2007; 8 Suppl 1:S6.

Niwa T, Yabusaki Y, Honma K, Matsuo N, Tatsuta K, Ishibashi F, Katagiri M. Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica* 1998; 28:539–47.

Nogal ABS. Influência de polimorfismos na família CYP3A no desenvolvimento de tumores sólidos. Tese de Mestrado apresentada a Universidade do Porto, Portugal – Porto, 2008.

Pharoah PDP, Antoniou AC, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nature Gen* 2006; 31(1):33-36.

Pharoah PDP, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:2796-2803.

Ramos EHM. Associação entre polimorfismos do gene do receptor alfa de estrogênio com a densidade mamográfica em mulheres após a menopausa. Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo – São Paulo, 2009.

Rylander-Rudqvist T, Wedrén S, Granath F, Humphreys K, ahlberg S, Weiderpass E, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Persson I. Cytochrome

P450 1B1 gene polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2003; 24 (9): 1533-1539.

Santos RA. Polimorfismos nos gene CYP17, CYP1B1, CYP1A1 e COMT em lesões genômicas espontâneas em pacientes com câncer de mama. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2007.

Schaik RHN. Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Invest New Drugs* 2005; 23: 513-522.

Schaik RHN, de Wildt SN, van Iperren NM, Uitterlinden AG, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch caucasians. *Clin Chem* 2000; 46(11):1834-1836.

Shatalova EG, Walther SE, Favorova OO, Rebbeck TR, Blanchard RL. Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study. *Breast Cancer Res* 2005; 7(6):R909-R921.

SEER - Surveillance Epidemiology and End Results webpage. www.seer.cancer.gov.

Taioli E, Radunali J, Chen X, Toniolo P, Garte SJ. A CYP1A1 Restriction Fragment Length Polymorphism is Associated with Breast Cancer in African American Women. *Cancer Res* 1995; 55:3757-3758.

Thompson PA, Ambrosone C. Molecular Epidemiology of Genetic Polymorphisms in Estrogen Metabolizing Enzymes in Human Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 27:125-34.

Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, Strax P, Pasternack BS. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:190-197.

Torresan C, Oliveira MMC, Torrezan GT, de Oliveira SF, Abuázar CS, Losi-Guembarovski R, Lima RS, Urban CA, Cavalli IJ, Ribeiro EM. Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. *Clin Exp Med* 2008; 8:65-71.

Travis RC, Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 2003; 5:239-247.

Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP. Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1988; 263:424-36.

Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syttan AC, Kindmark A, Landegren U, fermér 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:R437-R449.

Yager JD, Davidson NE. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006; 354:270-282.

Yager JD. Endogenous Estrogens as Carcinogens Through Metabolic Activation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 27:67-73.

Yaich L, Dupont WD, Cavener DR and Parl FF. Analysis of PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res* 1992; 52 (1):77-83.

Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P, Levitz M, Shore RE, Koenig KL, Banerjee S, Strax P, Pasternack BS. Endogenous estrogens and risk of breast cancer by estrogen receptor status: a prospective study in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4:857-860.

Contents lists available at ScienceDirect

Medical Hypotheses

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mehy

Is Gilbert Syndrome a new risk factor for breast cancer?

Rafael Haddad Astolfi^{a,*}, Diogo Diniz Gomes Bugano^b, Alice Aparecida Rodrigues Ferreira Francisco^c, Marcelo Moreira Tavares de Souza^d, Suzane Kioko Ono-Nita^e, Edmund Chada Baracat^f

^a Medical School, Universidade de São Paulo, Brazil

^b Department of Internal Medicine, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brazil

^c Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, Brazil

^d Biomedic, Department of Hepatology, University of São Paulo, Brazil

^e Department of Gastroenterology, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brazil

^f Department of Gynecology, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2010

Accepted 23 March 2011

Available online xxxx

ABSTRACT

Patients with Gilbert Syndrome have an impaired function of the enzyme UGT1A1, responsible for the degradation of 4-OH-estrogens. These elements are produced by the degradation of estrogens and are well-known carcinogens. In theory, patients with Gilbert Syndrome accumulate 4-OH-estrogens and, therefore, might have a higher risk for breast cancer, especially when exposed to higher levels of estrogens. If this theory is true, a new risk group for breast cancer would be described, producing new insights in breast carcinogenesis.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Breast cancer is the leading cause of cancer death among women. Incidence varies worldwide, ranging from 3.9 cases/100,000 adult population in Mozambique to 101.1/100,000 in the United States, where, according to the American Cancer Society (ACS), 207,090 new cases are expected in 2010. While survival rates can be as low as 36% for stage III disease, if diagnosed early, 76% of patients will be alive after 10 years of follow-up [1], highlighting the importance of developing new methods for prevention and screening.

Breast cancer is associated with hormones, and the exposure to high levels of endogenous and exogenous estrogens (estrone, estradiol and estril) during life has been proven to play an important role in carcinogenesis [2,3]. Women without functioning ovaries who do not receive Hormone Replacement Therapy (HRT) rarely develop breast cancer [4] and those with fewer ovulatory cycles (late menarche, early menopause and early pregnancy) [4,5] have a reduced risk for the disease.

Estrogens are associated with proliferation and maturation of breast tissue, acting through intracellular receptors that promote the activation of transcription factors, the transcription of mitochondrial DNA and the production of secondary messengers such as cAMP [6], TGF alpha and EGF [7]. However, it has been recently discovered that the degradation products of estrogens also have a proliferative action [7] and, in some cases, cause damage to DNA [8].

The inactivation of these products is done through conjugation, which is regulated by a series of enzymes, including UDP-glucuroniltransferase-1 (UGT1A1). Patients with Gilbert's Syndrome (GS) have a lower activity of UGT1A1, which, in theory, may lead to an accumulation of carcinogenic products of the metabolism of estrogens. Therefore, we speculate that patients with Gilbert Syndrome have a higher risk for breast cancer.

Background of the hypothesis

Genetic basis of Gilbert Syndrome

The genetic basis of GS was elucidated in 1995 [9]. Most patients with the disease have an insertion of one extra thymine-adenine (TA) repetition in the TATA box in the promoter region of the UGT1A1 gene. While normal individuals have only six TA repeats, those with GS have seven or more, building up the genotype UGT1A1 × 28 [10], which leads to a 20% reduction in gene expression, and an 80% decrease in UGT1A1 activity [11,12]. The prevalence of this polymorphism is 5% in Asians, 10% in Caucasians and 25% in Afro-Americans [13].

Relationship between breast cancer and UGT1A1 × 28

Estrogens have well-known proliferative actions on breast, endometrium and bone tissues; however, this is usually associated with tissue maturation, not loss of differentiation, such as the one in cancer cells. On the other hand, besides the epidemiological evidence that estrogens are strongly related to breast cancer, there is laboratory data showing that cell cultures receiving large amounts

* Corresponding author. Tel.: +55 11 97970045.

E-mail address: rafael.astolfi95@gmail.com (R.H. Astolfi).

Fig. 1. Synthesis and degradation of estrogens.

of estrogens accumulate damage to the DNA, with cell death and, later, carcinogenesis [14].

Much of the carcinogenic ability of estrogens have been associated to one of its metabolites, the 4-OH-estrogens (see Fig. 1). These molecules are able to bind DNA [15] and have been proven to induce adenocarcinoma of the endometrium in an animal model [16]. The same has been suggested by human studies, that showed higher levels of 4-OH-estrogens in breast cancer patients, when compared to healthy controls [17].

The elimination of 4-OH-estrogens is based on their association to radicals such as sulfate, glucuronosil and glutathione, through reactions catalyzed by enzymes of the families of sulfotransferases (SULT), glucuronosyltransferase (UGTs) and glutathione transferases (GST), respectively. In theory, patients with Gilbert Syndrome would have a greater risk for breast cancer due to an accumulation of 4-OH-estrogens.

Two studies have positively linked UGT1A1 × 28 with an increased risk of breast cancer. One in women with a family history [18], and another in Chinese without other risk factors related to estrogen [19]. This polymorphism was also associated with tumors most likely to reach a size greater than 2 cm [18] and with later diagnosis [20], also increasing the levels of circulating estrogens [21].

Hypothesis

Given the fact that patients with Gilbert's Syndrome harbor the polymorphism UGT1A1 × 28, it is reasonable to suggest that they have a higher risk for breast cancer, especially if exposed to higher concentrations of exogenous hormones.

Discussion

There is a reasonable biological explanation, laboratory evidence and, up to certain degree, clinical evidence that patients

with Gilbert Syndrome have a higher risk for breast cancer; however, this association has been poorly evaluated. We believe that this may have several explanations.

First, despite its high prevalence (3–7% in the US population, up to 13% in other populations) the disease has been considered fairly benign and, therefore, little attention has been given to other symptoms it might have, besides jaundice. What is more, most patients are asymptomatic and are never diagnosed, what impairs epidemiological studies. Finally, the syndrome itself may be caused by other polymorphism, such as G71R and Y486D [22], making it difficult for genetic association studies focusing solely on the UGT1A1 × 28 to describe the real relation between the syndrome and any disease.

Another possible explanation would be the fact that all studies have focused on the genetic diagnosis of the syndrome. It is reasonable to think that patients who have had episodes of jaundice have a lower UGT1A1 activity and, therefore, a higher risk for breast cancer, than asymptomatic patients with the syndrome. To our knowledge, there have been no studies comparing the rate of jaundice in breast cancer patients to healthy subjects.

After all, we believe that this association should be further investigated, due to the high prevalence of the syndrome, the presence of a simple, reliable and relatively cheap method for its diagnosis, the insights it would bring to the understanding of breast cancer carcinogenesis and, finally, due to the high burden of the disease. Ideally, the incidence of breast cancer should be studied in patients with Gilbert Syndrome, especially those with a known history of jaundice and an important exposure to estrogens.

Potential therapeutic implications

If this hypothesis is confirmed and patients with Gilbert Syndrome have higher risks for breast cancer, a completely new strategy for screening and early diagnosis of breast cancer must be developed specifically for this new risk group. Also, there's the

possibility that these patients are at higher risk when receiving exogenous estrogens.

Conflicts of interest

The authors do not declare any conflict of interest.

References

- [1] Woodward WA, et al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3244–8.
- [2] Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *Natl Cancer Inst* 1995;87:190–7.
- [3] Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P, Levitz M, et al. Endogenous estrogens and risk of breast cancer by estrogen receptor status: a prospective study in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:857–60.
- [4] Beral V, Bull D. Breast cancer and hormone replacement therapy: Collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *Lancet* 1997;350(9084):1047. 13 p, 15 charts, 1 graph.
- [5] Lambe, et al. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med* 1994;331(1):5–9.
- [6] Gilbert A, Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Sem Med* 1901;21:241–3.
- [7] Clemons M, Goss P. Estrogen and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2001;344(4).
- [8] Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000;21:40–54.
- [9] Bosma P, Chowdhury JR, Jansen PH. Genetic inheritance of Gilbert's Syndrome. *Lancet* 1995;346(8970):314–5.
- [10] Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 2003 Jan;38(1):107–17.
- [11] Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de BA, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. *N Engl J Med* 1995;333(18):1171–5.
- [12] Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(14):8170–4.
- [13] Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, de SS, Arambepola M, et al. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): hematologic and evolutionary implications. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31(1):98–101.
- [14] Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000;27:67–73.
- [15] Li KM et al. Metabolism and DNA binding studies of 4-hydroxyestradiol and estradiol-3, 4-quinone in vitro and in female ACI rat mammary gland in vivo. *Carcinogenesis* 2004;25(2):289–97.
- [16] Retha R, Newbold RR. Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res* 2000;60(2):235–7.
- [17] Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344(4):276–85.
- [18] Shatalova EG, Loginov VI, Braga EA, et al. Association of polymorphisms in SULT1A1 and UGT1A1 Genes with breast cancer risk and phenotypes in Russian women. *Mol Biol (Mosk)* 2006;40(2):263–70.
- [19] Adegoke OJ, Shu XO, Gao YT, et al. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;85(3):239–45.
- [20] Shatalova EG, Walther SE, Favorova OO, Rebbeck TR, Blanchard RL. Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study. *Breast Cancer Res* 2005;7(6):R909–21.
- [21] Sparks R, Ulrich CM, Bigler J, et al. UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase polymorphisms, sex hormone concentrations, and tumor receptor status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2004;6(5):R488–98.
- [22] Yamamoto, K et al. Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochim Biophys Acta* 1998;1406(3):267–73.