MARILENE ALÍCIA SOUZA

**Densidade mamográfica e polimorfismo do gene do receptor
estrogênico em mulheres após a menopausa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Marilene Alicia

Densidade mamográfica e polimorfismo do gene do receptor estrogênico em
mulheres após a menopausa / Marilene Alicia Souza. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Neoplasias da mama 3.Fatores de
risco 4.Receptores estrogênicos 5.Mamografia 6.Pós-menopausa

USP/FM/DBD-122/14

Dedicatória

*Ao meu filho Victor Hugo,
por todo amor.
Meu bem mais precioso.*

*Ao meu marido Pedro Hortense,
pelo apoio inequívoco a este trabalho e
encorajamento na perseguição dos meus sonhos.
A ele todo o meu amor.*

*A minha formação como profissional não poderia ter sido
concretizada sem a ajuda de meus amáveis e eternos pais Maria
Helena e Jair de Souza e meus irmãos, que, no decorrer da minha
vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os
conhecimentos da integridade, da perseverança e, em Deus, a
busca da força maior para o meu desenvolvimento como ser
humano.*

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.

*Obrigada Prof. Dra. Angela Maggio da Fonseca e
Prof. Dr. Edmund Chada Baracat.*

Agradecimentos

A Deus, dedico o meu agradecimento maior, porque têm sido tudo em minha vida.

Um agradecimento especial ao meu querido Professor Vicente Renato Bagnoli, que, com seu olhar crítico e construtivo, ajudou-me a superar os desafios desta tese. Minha eterna gratidão.

Ao Dr. José Maria Soares Jr, que me ajudou durante o percurso deste trabalho.

Ao Dr. Nestor de Barros e equipe de radiologia, pelas imagens fornecidas que permitiram significativamente esta realização.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular (LIM 58), Dra Kátia Cândido Carvalho, pelas preciosas orientações e por ter-me despertado o interesse pela genética: Thiago H Gonçalves e Marina F Almeida, pela colaboração na extração do DNA e determinação dos polimorfismos.

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

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

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

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

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

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

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

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

A minha secretária Roseli Tânia L Barbosa e enfermeira Cristiane Silva, pela dedicação.

Apoio Financeiro

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

Processo: 2009/54563-0

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua 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.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1	Epidemiologia do câncer de mama.....	07
2.2	Fatores de risco.....	10
2.3	Anatomia da glândula mamária.....	13
2.4	Densidade mamográfica.....	15
2.5	Densidade mamográfica e câncer de mama.....	20
2.6	Genética e câncer de mama.....	27
2.7	Polimorfismos do gene do receptor estrogênico e densidade mamográfica.....	31
2.8	Polimorfismo SNPs Pvull e Xbal.....	35
2.9	Microssatélite (GT)n.....	43
2.10	Receptor estrogênico.....	45
3	OBJETIVO.....	49
4	MÉTODOS.....	53
4.1	Critérios de inclusão.....	56
4.2	Critérios de exclusão.....	56
4.3	Entrevista e exame físico.....	56
4.4	Exames subsidiários de análise clínica.....	57
4.5	Classificação das mamografias.....	57
4.6	Determinação da densidade mamográfica.....	58
4.7	Coleta de material biológico.....	61
4.7.1	Extração do DNA de sangue periférico.....	61
4.7.2	Quantificação do DNA.....	62
4.7.3	Reação em cadeia de polimerase para o íntron 1 do gene do Rea.....	63
4.7.4	PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	64
4.7.5	Determinação dos microssatélites (GT)n.....	65

4.7.5.1	Reação de sequenciamento.....	65
4.7.5.2	Precipitação e purificação do produto da reação de sequenciamento com “Isopropanol”.....	66
4.7.6	Controles internos do PCR.....	68
4.7.7	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	69
4.7.8	Distribuição dos Haplótipos.....	70
4.8	Método Estatístico.....	73
5	RESULTADOS.....	75
5.1	Caracterização da densidade mamográfica.....	77
5.2	Associação entre as Características Clínicas e a Densidade Mamográfica.....	79
5.3	Associação entre os Polimorfismos e a Densidade Mamográfica.....	84
5.3.1	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	84
5.3.2	Distribuição dos genótipos.....	85
5.3.3	Distribuição dos alelos.....	87
5.3.4	Distribuição dos haplótipos.....	88
5.4	Regressão Logística Multivariada.....	91
5.5	Associação da Densidade Mamográfica e Exames Laboratoriais de Análise Clínica.....	92
5.6	Associação entre os grupos de Polimorfismos PvuII, XbaI, (GT) _n e as Características Clínicas.....	93
5.7	Frequência <i>REα-397 PvuII C/T</i> neste e em outros estudos.....	94
5.8	Frequência <i>REα-351 XbaI A/G</i> neste e em outros estudos.....	95
6	DISCUSSÃO.....	97
6.1	Fatores clínicos associados ao câncer de mama e densidade mamográfica.....	100
6.2	Densidade mamográfica e polimorfismo do gene do receptor estrogênico.....	107
7	CONCLUSÃO.....	115
8	ANEXOS.....	119
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
	APÊNDICES	

Listas de abreviaturas e símbolos

ACR	American College of Radiology
BI-RADS	Breast Imaging Reporting and Data System
BRCA	Breast Cancer
CM	Câncer de Mama
COMT	Catecol_O_Metil Transferase
CYP	Citociosino P450
DM	Densidade Mamográfica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DGRs	Genes Reparadores do DNA
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESR1	Gene do Receptor Estrogênico Alfa
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INRAD	Instituto de Radiologia
KD	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante
ml	Mililitro
ng	Nanograma

OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
<i>PvuII</i>	Enzima de restrição que foi isolada da bactéria <i>Proteus vulgaris</i>
QualIM	Laboratório de Qualificação de Imagens Médicas
RE	Receptor Estrogênico
REα	Receptor Estrogênico alfa
REβ	Receptor Estrogênico beta
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA_m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RP	Receptor de Progesterona
rpm	rotações por minuto
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i> - ou microssatélites
TH	Terapia Hormonal
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
UDLT	Unidade Ducto-Lobular Terminal
μl	Microlitro
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade
<i>XbaI</i>	Enzima restrição que foi isolada da bactéria <i>Xanthomonas badrii</i>
WHO	World Health Organization

Listas de figuras

Figura 1	Taxas de incidência mundial de câncer.....	07
Figura 2	Taxa de mortalidade mundial por câncer.....	08
Figura 3	Taxa de incidência e morte por câncer por 100.000 habitantes no Brasil.....	09
Figura 4	Taxa de mortalidade específicas por idade, câncer de mama feminina, por 100.000 mulheres. Brasil, 1995 a 2009.....	10
Figura 5	Anatomia da glândula mamária.....	14
Figura 6	Representação dos quatro padrões de densidade mamográfica segundo a classificação do BI-RADS®.....	17
Figura 7	Método quantitativo para medir a densidade da mama.....	19
Figura 8	Involução mamária com o aumento da idade.....	20
Figura 9	Combinação dos efeitos de proliferação celular (mitogênicos) e os danos celulares causados por agentes genotóxicos (mutagênicos).....	25
Figura 10	Idade, densidade mamográfica e câncer de mama.....	26
Figura 11	Mecanismos envolvidos no controle da divisão celular.....	28
Figura 12	Receptores nucleares em ação.....	33
Figura 13	Estrutura dos domínios funcionais e descrição dos polimorfismos do gene do receptor estrogênico humano.....	35
Figura 14	Receptor estrogênico.....	46
Figura 15	(a)mostra receptor estrogênico ligado ao DNA. (b) mostra a estrutura dimensional do RE α e RE β ligado ao estradiol.....	46
Figura 16	Seleção da área mamária total pelo programa Imaging J.....	59
Figura 17	Seleção da área mamária de predominância fibroglandular, pelo programa Imaging J.....	60
Figura 18	Perfil do DNA genômico extraído a partir de amostras de sangue das pacientes com mamas densas.....	63

Figura 19	Fragmentos de PCR referentes ao íntron 1 do receptor de estrogênio alfa.....	64
Figura 20	Primer da região promotora contendo os tandem repeats GT do gene do R α	65
Figura 21	Gráfico representativo do sequenciamento gênico da região promotora do receptor estrogênico alfa de paciente com mama densa.....	68
Figura 22	Diagramas esquemáticos de R α e o gene do receptor estrogênico 1 (ESR1).....	72
Figura 23	Gráfico com a distribuição da densidade mamográfica de 463 mulheres após a menopausa, determinada por dois observadores independentes.....	78

Listas de tabelas

Tabela 1	Risco relativo VS fatores de risco para desenvolvimento de câncer de mama.....	12
Tabela 2	Padrões mamográficos segundo ACR-BIRADS®.....	16
Tabela 3	Estudos coorte com classificação quantitativa da DM e risco de câncer de mama.....	23
Tabela 4	Genes de suscetibilidade ao CM e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem CM.....	36
Tabela 5	Estudos de associação do polimorfismo do gene do RE α -397 Pvull C/T com câncer de mama e/ou com fatores de risco para a doença.....	41
Tabela 6	Estudos de associação do polimorfismo do gene do RE α -351 Xbal A/G com câncer de mama e/ou com fatores de risco a doença.....	42
Tabela 7	Frequência do alelo polimórfico (GT) $_n$ do RE α em casos de câncer de mama e em controles sadios.....	45
Tabela 8	Classificação das Mamografias segundo ACR-BIRADS® (2003).....	58
Tabela 9	Grau de concordância entre os dois observadores na determinação da densidade mamográfica, segundo os índices de correlação de McNema.....	77
Tabela 10	Distribuição dos padrões de densidade mamográfica na população estudada de acordo com o observador objetivo.....	78
Tabela 11	Comparação entre os grupos de mama densa e não densa nas variáveis quantitativas.....	80
Tabela 12	Descrição das variáveis qualitativas.....	81
Tabela 13	Regressão logística, tendo como variável dependente Mama Densa e variável independente IMC.....	83
Tabela 14	Distribuição dos polimorfismos com verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	85
Tabela 15	Associação entre tipo de mama e polimorfismo Pvull.....	86
Tabela 16	Associação entre tipo de mama e polimorfismo Xbal.....	86
Tabela 17	Associação entre tipo de mama e polimorfismo de repetição (GT) $_n$	87
Tabela 18	Distribuição alélica dos polimorfismos Pvull e Xbal entre os grupos de densidade mamográfica e resultados referentes ao teste de Qui-Quadrado.....	88
Tabela 19	Frequência dos haplótipos Pvull x Xbal	90
Tabela 20	Regressão logística múltipla.....	91

Tabela 21	Associação entre tipo de mam e exame laboratoriais de análise clínica.....	92
Tabela 22	Associação entre polimorfismo Pvull, Xbal, (GT)n e as características clínicas estudadas.....	94
Tabela 23	Frequência REα-397 Pvull C/T neste e em outros estudos.....	95
Tabela 24	Frequência do REα-351 Xbal A/G neste e em outros estudos.....	96

Souza MA. *Densidade mamográfica e polimorfismo do gene do receptor estrogênico em mulheres após a menopausa* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Receptores hormonais modulam a resposta dos tecidos ao estímulo humoral. Evidências epidemiológicas mostram que as variações dos genes que regulam a biossíntese e metabolização dos receptores estrogênicos (RE) causam alterações no efeito dos estrógenos no tecido mamário, podendo explicar as variações individuais da densidade mamográfica. A alta densidade mamográfica é um fator de risco importante para o câncer de mama. **Objetivo:** Avaliar a associação das características clínicas e dos polimorfismos do gene do RE α (*Xba*I, *Pvu*II e *(GT)**n*) com a densidade mamográfica em mulheres após a menopausa. **Casística e métodos:** Avaliaram-se prospectivamente 463 mulheres após a menopausa, sendo que 308 mulheres com mamas densas e 155 com mamas não densas, segundo os critérios do ACR-BIRADS (2003) por avaliação objetiva computadorizada, com idade de 45 a 60 anos, não usuárias de terapia hormonal nos últimos 12 meses e sem antecedentes pessoais de câncer de mama. Amostras de sangue periférico foram obtidas para extração de DNA e análise dos polimorfismos presente no íntron 1 e região promotora (*Xba*I, *Pvu*II e *(GT)**n*) do gene do RE α . **Resultados:** Dos fatores considerados de risco para o câncer de mama, houve associação com a densidade mamográfica: idade ($p=0,005$); medida da cintura abdominal ($p=0,001$); número de gravidezes ($p=0,007$); idade ao ter o 1º filho ($p=0,035$); antecedentes familiares ($p=0,035$); tempo decorrido deste a data da última menstruação ($p=0,007$) e índice de massa corpórea ($p=0,022$). Foi verificada diferença significativa entre os grupos de mama densa e não densa para distribuição do genótipo do polimorfismo *Pvu*II ($p=0,024$). *Xba*I ($p=0,362$) e, para o polimorfismo de repetição *(GT)**n* ($p=0,151$) a associação não foi significativa. **Conclusão:** Apenas o polimorfismo *Pvu*II e os fatores clínicos: idade, cintura abdominal, número de gravidezes, idade ao ter o primeiro filho, antecedentes familiares de câncer de mama, tempo decorrido desde a data da última menstruação e o índice de massa corpórea mostraram-se associados com a densidade mamográfica após a menopausa.

Descritores: Polimorfismo genético; Neoplasias da mama; Fatores de risco; Receptores estrogênicos; Mamografia; Pós-menopausa.

Summary

Souza MA. Mammographic density and polymorphism of the estrogen receptor gene in women after menopause [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: The hormone receptors modulate the tissue response to hormonal stimulation. Epidemiological evidences show that the variations in genes that regulate the biosynthesis and metabolism of estrogen receptors (ER) cause changes in the effect of estrogen in breast tissue, which may explain individual variations of the mammographic density. High mammographic density is an important risk factor for the breast cancer.

Objective: Evaluating the association of clinical characteristics and polymorphisms of the gene ER α [*Xba*I, *Pvu*II and (GT)*n*] and mammographic density in postmenopausal women. **Methods:** It was prospectively evaluated 463 postmenopausal women - 308 women with high mammographic density (HMD) and 155 controls (to 50% density or less), according to the criteria of the ACR - BIRADS (2003) computed objective assessment , aged 45 to 60 , nonusers of hormone therapy in the past 12 months and with no personal history of breast cancer. Peripheral blood samples were obtained for DNA extraction and analysis of this polymorphism in *intron* 1 and promoter [*Xba*I, *Pvu*II and (GT) *n*] of the ER α gene region. **Results:** Among the risk factors for breast cancer there was an association with mammographic density: age ($p = 0.005$), waist circumference ($p = 0.001$), number of pregnancies ($p = 0.007$), age of first birth ($p = 0.035$), family history ($p = 0.035$), time after menopause ($p = 0.007$) and body mass index ($p = 0.022$). Significant difference was observed between the groups of HMD and control only for the distribution of the polymorphism *Pvu*II ($p = 0.024$). *Xba*I ($p = 0.362$) and for repeat polymorphism (GT) *n* ($p = 0.151$) the association was not significant. **Conclusion:** Only the *Pvu*II polymorphism and clinical factors: age, waist circumference, number of pregnancies, age of first birth, family history of breast cancer, time after menopause and body mass index proved to be associated with high mammographic density after menopause.

Descriptors: Polymorphism, genetics; Breast neoplasms; Risk factors; Receptors, estrogen; Mammography; Postmenopause.

1. Introdução

A população brasileira vem experimentando mudanças significativas no seu perfil demográfico, a queda da taxa de fecundidade e o aumento da expectativa de vida, decorrentes da melhora de condições sanitárias, fizeram com que houvesse progressivo crescimento na população de idosos. Esta mudança trouxe aumento na incidência de doenças crônico-degenerativas, dentre elas o câncer nas suas diferentes manifestações. O câncer de mama (CM) é a forma de câncer mais comum entre mulheres, perfazendo, aproximadamente, 23% de todos os tumores femininos (American Cancer Society, 2013). Embora a mortalidade esteja diminuindo em alguns países, o CM ainda representa a causa mais frequente de morte em mulheres entre 35 – 55 anos de idade. O amplo entendimento dos fatores de risco para o câncer de mama resulta numa melhor compreensão daqueles processos biomoleculares que levam à doença e permite aos profissionais da saúde oferecer informação, respostas objetivas e aconselhamento aos questionamentos suscitados. O reconhecimento dos fatores de risco de uma patologia e seu adequado manejo quanto ao rastreio, tratamento e prevenção, são de essencial importância em termos de saúde pública, visando à diminuição de sua incidência e, por conseguinte, de sua prevalência. O estudo de polimorfismos relacionados à doença consiste em ferramenta que poderá ter implicação direta e de grande importância na análise da suscetibilidade individual ao CM, no entendimento da resposta a diversos fármacos e prognóstico. O objetivo final dessas estratégias é reduzir a ansiedade das pacientes e melhorar consideravelmente a

abordagem e o manejo de uma mulher de risco ou não, facilitando a implementação, o planejamento e a adoção de estratégias preventivas.

O estudo dos polimorfismos em genes de baixa penetrância, associados previamente a aumento de risco para CM e alta densidade mamográfica em mulheres após a menopausa, motivou este trabalho.

2. Revisão da literatura

2.1 Epidemiologia do câncer de mama

Há cerca de quarenta anos, o câncer de mama era considerado uma doença de países desenvolvidos, no entanto, nos últimos anos, observou-se aumento na incidência e mortalidade nos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil. De acordo com o banco de dados GLOBOCAN, em 2008, este foi o câncer mais diagnosticado no mundo e líder em causa de morte nas mulheres, perfazendo 23% (Figura 1) de todos os casos de câncer e 14% das mortes por câncer (Figura 2). Logo, é considerado um problema de saúde pública, tanto pela extensão e custo social da doença, como pelo custo financeiro necessário ao seu adequado diagnóstico e tratamento.

FONTE: <http://www-dep.iarc.fr/globocan.iarc.fr/> (acessado em 03-08-2013)

Figura 1 - Taxa de incidência mundial de cancer

FONTE: <http://www-dep.iarc.fr/globocan.iarc.fr/> (acessado em 03-08-2013)

Figura 2 - Taxa de mortalidade mundial por câncer

Segundo a *American Cancer Society*, foram diagnosticados, em 2013, nos Estados Unidos (EUA), 232.340 novos casos de câncer invasivo, e 39.620 mulheres morreram de câncer de mama. Observou-se aumento da incidência de CM feminina por mais de duas décadas; porém, nos EUA, a partir do ano 2000, esta taxa começou a diminuir e atualmente tem se mantido estável.

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama também é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, exceto na região Norte, onde o câncer do colo do útero ocupa a primeira posição. No ano de 2012 ocorreram 52.680 casos novos, que representam taxa de incidência de 52 casos por 100 mil mulheres. A taxa de mortalidade por câncer de mama ajustada pela população mundial apresenta curva ascendente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira (figura 3), com 15,2 óbitos/100 mil mulheres em 2012 (INCA. Atlas de Mortalidade, 2013). Esse padrão é semelhante nas diferentes

regiões brasileiras, com exceção da região Norte, onde os óbitos por câncer de mama ocupam o segundo lugar, com 10,8%. Os maiores percentuais na mortalidade proporcional por câncer de mama são os do Sudeste (16,6%) e Sul (14,7%), seguidos das regiões Nordeste (13,6%) e Centro-Oeste (13,3%) (BRASIL. Datasus/SIM, 2013).

FONTE: GLOBOCAN 2008

Figura 3 - Taxa de incidência e morte por câncer por 100.000 habitantes no Brasil

O câncer de mama é raro antes dos 40 anos e a partir dessa idade a incidência tende a crescer progressivamente. A mortalidade também aumenta gradativamente com a idade, conforme dados para o Brasil apresentados na figura 4 (BRASIL. Datasus/SIM, 2013).

FONTE: INCA – Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama, 2013.

Figura 4 - Taxas de mortalidade específicas por idade, câncer de mama feminina, por 100 mil mulheres. Brasil, 1995 a 2009

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

2.2 Fatores de risco

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

Ser do sexo feminino é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Esta doença é 100 vezes mais incidente nas mulheres do que nos homens.

A idade constitui outro importante fator de risco e a taxa de incidência apresenta curva ascendente a partir dos 25 anos, concentrando a maioria dos casos na faixa etária acima dos 45 anos. Cerca de um de oito casos de câncer de mama invasivos são encontrados em mulheres com menos de 45 anos, enquanto que dois de três casos de câncer invasivo de mama são detectados em mulheres com 55 anos ou mais (American cancer society, 2013).

História familiar é importante fator de risco, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade. Entretanto, o CM de caráter familiar corresponde aproximadamente a 10% de todos os casos. A causa mais comum de câncer de mama hereditário é aquela associada a mutações germinativas em genes de alta penetrância BRCA1/2. As portadoras de mutações nestes genes apresentam risco cumulativo vital de 50-85% de desenvolver CM (WHO, 2013).

Fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do CM tais como: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos e menopausa tardia após os 50 anos de idade (Tabela 1) (American Cancer Society , 2013).

Densidade mamográfica é um forte fator de risco para o câncer de mama, com risco estimado entre quadro a seis vezes maior para mulheres com tecido denso ocupando 75% ou mais da glândula mamária (Boyd, 2013).

Tabela 1- Risco relativo versus fatores de risco para desenvolvimento de câncer de mama

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

FONTE: ACS - American Cancer Society , 2013.

Obesidade e dieta inadequada (alta ingestão de gordura e baixa quantidade de fibras) são ligadas ao aumento do risco de CM desde os anos 70 (Waard e Baanders, 1974). Ganho de peso durante a vida adulta é associado ao aumento de risco de CM principalmente após a menopausa

(Pichard et al., 2008). Von Drygalski et al., em 2011, encontraram taxas de sobrevida com diferenças significantes quanto ao Índice de Massa Corpórea (IMC). Sobrevida média após o diagnóstico ou tempo médio de aparecimento de metástase para paciente com $IMC \leq 30$ e >30 foi de 7,1 (IC95%= 4,4 – 8,7) e 3,2 anos (IC=2,41 - 6,75), respectivamente.

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

2.3 Anatomia da glândula mamária

A mama, glândula sudorípara modificada, é composta de 15 a 20 lobos ramificados. Cada lobo contém numerosos lóbulos e pequenos ductos ramificados que progressivamente se unem para constituir ductos maiores e, finalmente, um único subareolar principal. Em direção oposta, esses ductos terminais finalizam-se em pequenas dilatações, originando 10 a 100 alvéolos e a esse conjunto terminal dá-se a denominação de lóbulo mamário. Este segmento ducto-lobular terminal (UDLT) representa a unidade funcional mamária, do qual a maioria dos cânceres se origina (Baracat & Kemp, 1998). Servindo de sustentação às estruturas epiteliais, encontra-se o tecido conjuntivo, que é altamente celular e vascularizado (Figura 5). A quantidade de UDLT é dependente da idade e influência hormonal. A mama madura sofre trocas cíclicas durante o ciclo menstrual. Estrógenos aumentam a proliferação celular e os progestógenos intensificam este efeito. Há também

aumento do volume mamário e do conteúdo de água durante a fase luteal do ciclo. Deprivação aguda dos estrógenos e progestógenos causam aceleração da morte celular, ou apoptose, havendo, portanto, diminuição da DM durante a menstruação (Harvey e Bovbjerg, 2004).

FONTE: Modificado de Hollenbeck et al. 2013.

Figura 5 - Anatomia da glândula mamária. A. Dissecção de quadrante (sentido anti-horário) da mama humana revela gordura subcutânea, os lóbulos da mama contendo tecido conectivo intralobulares, ductos lactíferos e gordura mamária. B. A unidade ducto-lobular terminal a qual contém células epiteliais, membrana basal, os fibroblastos estromais, células adiposas, células endoteliais, e células do sistema imunológico. Cada tipo de célula contribui para a densidade

Durante o período da perimenopausa, o ciclo menstrual encurta, com nível de estradiol maior do que nos anos anteriores, enquanto que as taxas de progesterona diminuem. Cistos mamários são mais comuns entre a idade de 40 a 49 anos possivelmente devido ao encurtamento da segunda

fase do ciclo menstrual e elevado nível de estrógenos, durante esse tempo (Stomper et al., 1996).

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

2.4 Densidade Mamográfica

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

A formação da imagem radiológica da mama resulta da superposição destes tecidos, visualizados à mamografia pelas diferentes densidades. Quanto maior a quantidade de gordura da mama, menor será a DM, ao passo que a maior proporção de tecido conjuntivo e epitelial

aumenta a densidade radiológica da mama. A imagem radiológica que se forma é conhecida como *padrão mamográfico*.

Wolfe foi o primeiro a classificar os padrões mamográficos e a associar essas variações na aparência mamográfica com o risco de desenvolver câncer de mama. Com ajuda de planímetro manual calculava a proporção entre as densidades radiológicas e a área total da mama, descrevendo quatro categorias: N1: mamas eminentemente adiposas; P1: mamas constituídas predominantemente por tecido adiposo, mas com áreas densas de predomínio ductal ocupando até 25% da área total mamária; P2: mamas com áreas densas de predomínio ductal ocupando 25% ou mais da área total; DY: mamas com extensas áreas densas nodulares (Wolfe, 1976).

Em 2003, o *American College of Radiology* (ACR), por meio do léxico BI-RADS® (*Breast Imaging Reporting and Data System*), atualizou e classificou os padrões mamográficos (Tabela 2 e Figura 6), correlacionando quantidade de densidade parenquimatosa com a sensibilidade do exame e não mais com maior ou menor risco para desenvolvimento de CM.

Tabela 2 - Padrões mamográficos segundo ACR-BIRADS®

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

FONTE: Ramos et al. 2006

Figura 6 - Representação dos quatro padrões de densidade mamográfica segundo a classificação do ACR-BIRADS®. Sendo A padrão mamográfico 1; B padrão 2; C padrão 3; D padrão 4

Entretanto, a variabilidade e a reprodutibilidade permanecem como os maiores problemas quanto às classificações das mamas em padrões de parênquima. Estudo de Nicholson et al, 2006. mostrou que os padrões BIRADS, com mamas quase totalmente compostas por tecido adiposo ou as extremamente densas, identificados por radiologistas, correlacionam-se muito bem com os percentuais de densidade obtidos com método computadorizado, enquanto as demais categorias, intermediárias, tiveram variação ampla, o que dificultaria sua utilização em estudos para cálculo de

risco. Recentemente, os métodos quantitativos computadorizados são os mais utilizados, gerando melhores aferições da densidade e com melhor reprodutividade (Martin et al, 2006).

Estudo de Boyd et al, em 1997, confirmou a importância da determinação precisa da densidade mamográfica, pois observou-se aumento de 2% no risco relativo para cada aumento de 1% no percentual da densidade mamográfica. Ainda, a mesma autora, em estudo publicado em 2007 no *New England Journal of Medicine*, que analisou a associação do percentual de densidade na mamografia inicial com o risco de câncer de mama, os resultados mostraram que, quando comparadas mulheres nas quais as áreas densas ocupavam superfície menor que 10% da mamografia, às mulheres com 75% ou mais, estas tiveram aumento de risco de câncer de mama (*Odds Ratio*=4,7; IC 95%=3,0 a 7,4). Além disso, em nova avaliação mamográfica com tempo menor que 12 meses após exame de rastreamento negativo, essas mulheres apresentaram 17 vezes maior chance de terem exame positivo para CM (OR=17,8; IC95%=4,8 a 65,9). No entanto, estes métodos assistidos por computador têm, atualmente, aplicação limitada na prática diária, devido ao tempo dispendido em cada análise. A figura 7 apresenta o método quantitativo para medir a densidade da mama pela classificação de Boyd.

Densidade Mamográfica

FONTE: Boyd 2013

Figura 7 - Método quantitativo para medir a densidade da mama. (à esquerda) Exemplos de densidade mamográfica. A: 0%, B: <10%, C: <25%, D: <50%, E: <75%, F: > 75%. (direita) Ilustração de medição de densidade mamográfica. Linha Vermelha apresenta a mama e a linha verde a área de maior densidade

Existem grandes variações nas mamas em uma mesma mulher, de acordo com fatores que possam modificar a proporção dos seus elementos, tais como: idade, paridade, tipo físico e estado hormonal. Em jovens, habitualmente, as mamas têm consistência firme e são de forma cônica, geralmente densas e sofrem, progressivamente, involução com o decorrer da idade (figura 8), aumentando o tecido adiposo e diminuindo o tecido epitelial, estromal e lobular. Essa involução mamária, no entanto, não é padrão em todas as mulheres. Algumas ainda mantêm padrão mamográfico denso, com predomínio de tecido fibroglandular. Stomper et al, 1996, encontraram 36% de mamas densas em mulheres com idade entre 55 a 59 anos e 30%, em mulheres entre 75 a 79 anos. Estudos em gêmeos

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

FONTE: modificado de Kobayashi et al, 2012

Figura 8 - Involução mamária com o aumento da idade

2.5 Densidade mamográfica e câncer de mama

Há mais de 30 anos, John Wolfe descrevia a associação de padrão mamográfico de alta densidade, ou seja, maior proporção de tecido glandular e estromal em relação ao tecido gorduroso na mama, ao aumento do risco para o câncer de mama – associação atualmente confirmada por muitos estudos bem conduzidos, que justificam a análise da incorporação da densidade mamográfica aos modelos de predição de risco individual de câncer de mama, como o de Gail (Machetti & Marana, 2007; Lope et al., 2012). Byrne et al (1995) também contribuíram para o entendimento da associação da DM e CM. Ao avaliarem a associação entre características mamográficas e fatores de risco para câncer de mama, verificaram que a

mama densa era fator de risco independente, quando relacionado à história familiar, idade ao primeiro parto a termo, etilismo e doenças proliferativas benignas da mama. Mulheres com mamas extremamente densas apresentavam risco cinco vezes maior para o desenvolvimento dessa neoplasia. Constataram, também, que esse efeito persistia por 10 anos.

A classificação ACR-BIRADS, em sua quarta edição, associou a abordagem quantitativa com a divisão em quartis da composição percentual por tecido glandular na mama. Embora esta última versão implique alguma subjetividade, ela apresenta a vantagem de ser rotineiramente empregada em laudos mamográficos, o que facilita sua aplicação em estudos epidemiológicos (ACR-BI-RADS, 2003). Comparando-se as mamas categorizadas como extremamente densas às lipossubstituídas, observou-se que há aumento do risco relativo de quatro a cinco vezes para desenvolvimento do câncer de mama entre as primeiras (Vacek & Geller, 2004; Cumming et al, 2009).

Em 2013, Boyd, em publicação, afirmou que atualmente existe ampla evidência de que a DM é um fator de risco para câncer de mama, com gradiente de seis vezes no risco entre as mulheres com 75% ou mais na densidade mamográfica em comparação àquelas com 10% ou menos. No entanto, a precisão da previsão de risco em mulheres individuais é modesta. A extensão da DM está inversamente relacionada com a idade, paridade, peso, e, também, diminui com a menopausa e uso de tamoxifeno. DM está positivamente associada com maior altura, história familiar de câncer de mama e apresenta aumento com a terapia hormonal

combinada. O risco relativo associado com a densidade mamográfica é substancialmente maior do que o risco relativo de câncer de mama associado à história familiar da doença ou a qualquer um dos fatores de risco menstruais e reprodutivos. Estima-se que o risco de CM atribuível à densidade de 50% ou mais pode ser 16% para CM. Embora o uso de tamoxifeno cause diminuição tanto na DM quanto no risco do CM, Boyd, em 2011, afirmou que as evidências ainda são insuficientes para responsabilizar se a diminuição do câncer é devido à redução na DM. No entanto, Li et al concluíram, em pesquisa na qual envolveram 974 mulheres com CM, que a diminuição na DM em pacientes com CM que receberam tamoxifeno adjuvante serve como marcador prognóstico para maior sobrevida (Li et al, 2013). Cuzick et al, 2011, também estudando se o uso do tamoxifeno poderia modificar o risco de desenvolver CM através da diminuição da DM, concluíram que a mudança na DM após 12 a 18 meses do início do tratamento é excelente indicador da resposta ao tamoxifeno na estratégia preventiva.

Em meta-análise sistemática de dados de mais de 14.000 casos e 226 mil controles de 42 estudos, McComark & Santos revisaram os dados sobre associação da DM com o risco de câncer de mama. Os nove estudos apresentados foram realizados nos Estados Unidos, Europa e Canadá e todos encontraram aumento estatisticamente significativo de risco associado à maior densidade mamográfica, após ajuste para outros fatores de risco e, ainda, os autores destacam que o aumento de risco persistiu por pelo menos oito a dez anos a partir da data da mamografia. Há também evidências de

relação dose-resposta, isto é, o risco aumenta com o aumento da DM. A tabela 3 resume as características selecionadas dos estudos coorte que usaram métodos quantitativos para classificar a DM (McComack & Santos, 2006).

Tabela 3- Estudos coorte com classificação quantitativa da DM e risco de câncer de mama

Autor / região	Idade	tamanho da amostra	Medição	Densidade mamográfica	OR (IC 95%)	seguimento em anos
Kato et al., EUA	35-65	197/521	Planimetria	Quartil superior contra inferior	3,6 (1,4-9,1) 4,3 (2,1-8,8)	5.5
Saftlas et al, EUA	35-74	266/301	Planimetria	<5% versus $\geq$ 65%	4.3 (3.1 a 6.1)	5
Byrne et al, EUA	35-74	1880/2152	Planimetria	0% versus $\geq$ 75%	3,5 (1,4-5,2) 2,9 (1,6 a 5,6)	10
Torres-Mejia et al, EUROPA	40-80	111/3100	Assistida por computador	0,5% versus > 46%	4,4 (3,0 a 6,7)	14
Van Gils et al, EUROPA	> 45	129/517	Assistida por comp	<5% versus > 25%	3,6 (2,3 a 5,6)	10
Maskarinec et al, EUA	60	607/667	Assistida por computador	<10% versus > 50%	a. 6,0 (2,8 a 13,0) b. 4,0 (2,1-7,7)	7
Boyd, CANADA	40-59	330	Estimativa	0% versus $\geq$ 75%	a. 4,5 (1,9-11,0)	7
			Assistida por computador		b. 4,4 (2,1 a 5,0)	
Boyd, CANADA	40-70	398	Estimativa	<10% versus $\geq$ 75%	a. 3,4 (1,1-10,3)	6
			Assistida por computador		b. 4,1 (2,0 a 8,6)	
Boyd, CANADA	50-69	386	Estimativa	<10% versus $\geq$ 75%	a. 4,7 (3,0 a 7,4)	8
			Assistida por computador		b. 4,4 (2,9 a 6,7)	

Martin e Boyd, em 2008, propuseram que a exposição acumulativa à alta DM poderia ser importante determinante da incidência de CM e que o risco de CM associado à DM pode ser explicado pela combinação de efeitos mitogênicos (os quais influenciam a proliferação celular e do tamanho da população de células na mama), e efeitos mutagênicos (os quais provocam provavelmente danos genéticos naquelas células), figura 9.

FONTE: Martin e Boyd,2008.

Figura 9 - (a) Combinação dos efeitos de proliferação celular (mitogênicos) e danos celulares causados por agentes genotóxicos (mutagênicos) podem sublinhar o aumento do risco de CM associado com alta DM. Aumento da proliferação celular amplia a susceptibilidade para mutações, mas também eleva a peroxidação lipídica, a qual pode aumentar novamente a proliferação celular. (b) Os componentes do tecido (células epiteliais, células estromais, colágeno e gordura) que são responsáveis pela variação na DM são ligados uns aos outros. Fibroblastos do estroma produzem colágeno. Células estromais e epiteliais são influenciadas por fatores de crescimento parácrinos e endócrinos (mitogênicos). Danos genéticos em células do estroma ou em células epiteliais causadas por agentes mutagênicos podem iniciar a carcinogênese

A DM declina com o aumento da idade; a incidência CM, no entanto, aumenta. Isto parece paradoxal, embora possa ser explicado pelo modelo proposto por Pike et al., 1983. De acordo com esse modelo, o que é relevante para o aumento do CM é o tempo em que o tecido mamário fica exposto à alta DM durante a vida (Figura 10). As taxas de proliferação do tecido mamário são mais rápidas no tempo da menarca, diminuem com a gravidez e perimenopausa e são mais lentas após a menopausa.

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

FONTE: Martin e Boyd , 2008.

Figura 10 - A esquerda mostra a idade específica da incidência do CM. Adaptado de Pike et al. À direita, o modelo de Pike onde se vê o tempo em que o tecido mamário está exposto à DM. 'b' representa o tempo de exposição à maior proliferação celular (e maior DM) terminando com a primeira gravidez a termo

Altas taxas de DM são comuns nos dias atuais. Nesse sentido, Blane et al., em 2002, afirmaram que CM atribuível ao tecido mamário denso pode se tornar mais prevalente no futuro. Os autores observaram que a DM obtida pelas mamografias nos anos 90 não declinavam tão rapidamente como aquelas obtidas nos anos 80 e verificaram que as causas desse aumento podem ser devido a fatores como: postergação da primeira gestação, dieta inadequada e nuliparidade, tornando os fatores de risco para CM cada vez mais significativos em nossa população. Harvey e Bovbjerg, em 2004, após revisão da literatura, reconheceram que somente anormalidades genéticas, idade, câncer de mama anterior e biopsia de mama com achados de carcinoma *in situ* são associados com similar ou maior risco relativo de CM, quando comparados à DM.

2.6 Genética e câncer de mama

O desenvolvimento do câncer é conduzido pelo acúmulo de uma série de alterações no código genético, as quais conferem vantagens de crescimento às células alteradas conduzindo-as à formação de tumores e, posteriormente, à metastatização; resultado do acúmulo progressivo de modificações no DNA, como observado na figura 11 (Wu e Shen, 2011).

As primeiras evidências a respeito de o câncer ser uma doença genética vieram de exames microscópicos de células tumorais, nos quais se verificou a presença de uma série de alterações na estrutura dos cromossomos. No entanto, somente nas últimas décadas, com o avanço das

técnicas de manipulação do DNA e detecção de mutações, os genes afetados por esses rearranjos cromossômicos puderam ser identificados. Nesse sentido, o estudo das bases moleculares da formação e progressão dos tumores gerou o conceito de que o câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo progressivo de mutações somáticas em genes que codificam proteínas envolvidas na regulação da proliferação celular (Wu e Shen 2011).

FONTE: Wu e Shen, 2011.

Figura 11 - Mecanismos envolvidos no controle da divisão celular

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

As mutações podem ocorrer tanto em células de linhagem germinativa (câncer hereditário), quanto em células somáticas (câncer esporádico). Noventa por cento dos CM são esporádicos, sem nenhum caráter familiar. Portanto, apesar de o câncer ser considerado uma doença genética, ele não é necessariamente uma doença hereditária.

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

No entanto, a maioria dos casos de CM não é explicada por alterações em genes de alta penetrância, mas sim, por alterações mais prevalentes, embora de baixa penetrância, sendo também chamados de genes de suscetibilidade, com participação isolada pequena, mas que

interagem entre si e também com fatores ambientais (Garcia-Closas e Chanock, 2008).

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

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

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

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

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

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

Publicações envolvendo mutações genéticas têm aumentado nesses últimos 20 anos. O interesse nesses polimorfismos reside no fato de que as variações nas sequências genômicas estão fundamentadas na suscetibilidade para desenvolver ou na capacidade para evitar doenças, como, por exemplo, o CM.

Entre os genes de suscetibilidade para o CM estão os genes dos receptores estrogênicos (RE). Desde a publicação de Zuppan et al. (1991), polimorfismos nesse gene têm sido relacionados com o risco para o CM.

2.7 Polimorfismos do gene do receptor estrogênico e densidade mamográfica

Evidências epidemiológicas indicam um papel fundamental para os hormônios sexuais no desenvolvimento do câncer de mama. Altos níveis circulantes de estrógenos e andrógenos têm sido consistentemente associados ao aumento do risco de CM em mulheres após a menopausa (Clendenen et al,2013).

Genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese, ação e metabolização dos esteróides sexuais são polimórficos. Essa condição pode contribuir para o desenvolvimento de doenças em vários tecidos hormônio dependentes, e, também, explicar as variações individuais na densidade mamográfica (Cai et al, 2003B). Candidatos incluem genes que codificam enzimas importantes no metabolismo de **hormônios esteroides** (COMT, CYP17, CYP19, CYP2D6, **RE** e RP), os relacionados à expressão de enzimas que participam no processo de carcinogênese (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT1 e NAT2), e os genes com alelos comuns, que têm sido identificados através de estudos com famílias (P53, BRCA1/2) (Dunning et al., 1999).

Sabe-se que os esteroides sexuais, principais reguladores da cinética do lóbulo mamário, são lipossolúveis, penetram passivamente no citoplasma e interagem com seus receptores, presentes no núcleo de células alvos, onde regulam a expressão gênica (Key, 2011). Os RE são membros da superfamília de receptores nucleares que controlam a transcrição gênica. As duas principais isoformas do RE são as α e β e apresentam distribuição e padrões de expressão genética distintos em diferentes tecidos (Figura 12).

FONTE: Gronemeyer et al., 2004.

Figura 12 - Receptores nucleares em ação. Modo de ação dos receptores nucleares (RN): após difundir-se pela membrana citoplasmática, o ligante pode interagir com receptores cognatos e exercer um efeito não genômico por interagir diretamente, como, por exemplo, com quinases (a). A razão de localização entre citoplasma e núcleo pode variar entre diferentes receptores e é afetada pela natureza do ligante. A ligação do ligante no receptor modula uma grande quantidade de fatores. Na ausência do ligante, vários RN são levados a se ligar com regiões regulatórias de genes-alvos com um complexo correpessor ou com histonas desacetilases (HDAC) (b). Histona desacetilase é responsável pela condensação da cromatina que causa o efeito silenciador do gene. A ligação do ligante dissocia o complexo HDAC (c) e resulta no recrutamento de histonas acetiltransferase (HAT) e de complexos de remodelação de cromatina (CRM) (d). A ordem temporal e o requerimento desses complexos podem ocorrer em um receptor, um gene-alvo ou em uma célula-específica. No último degrau (e), a holoenzima polimerase II, que inclui a enzima pol II, TAF (TATA fator de ligação associada à proteína), e complexos mediadores. Esse recrutamento aumenta a frequência da inicialização da transcrição. Abreviaturas: AD-domínio de ativação; AF1-função de ativação 1; NLS-sinal de localização nuclear

Tanto a proteína do RE α quanto a do RE β agem como fatores de transcrição, induzindo e ligando, contendo um domínio de ligação com o

DNA, um domínio de dimerização, um domínio de ligação ao hormônio e diversos domínios de ativação da transcrição (Osborne e Schiff, 2005). A expressão do RE α tem sido amplamente estudada em tumores de mama por ser importante mediador da resposta humoral e por estar envolvido em inúmeras ações dos estrógenos em células alvo, ao induzir, de modo direto, genes associados com o controle da proliferação e apoptose celular, como ciclina D1, TGF α , IGF1 e como receptores de progesterona (Harvey et al., 1999). Assim, os RE são tidos como fatores prognósticos no CM, sendo também preditivos de resposta à hormonioterapia, com taxas de até 70%, para aquelas com tumores RE+ (Li et al, 2013).

Para o presente estudo foram escolhidos os polimorfismos no gene do RE α : SNPs RE α -351 *Xba*I A/G, também denominado rs 9340799; e RE α -397 *Pvu*II C/T, rs 2234693; e o STRs RE α -(GT) n por estarem, em vários estudos, associados a aumento da DM e aumento do risco para o CM (Boyapati et al., 2005; Shin et al., 2003) (Figura 13). O gene do RE α localiza-se no cromossomo 6 (6q25.1), compõe-se de 8 éxons e abrange mais de 140 kb (Greene et al., 1986).

FONTE: Souza et al, 2012.

Figura 13 - Estrutura dos domínios funcionais e descrição dos polimorfismos do gene receptor de estrogênio humano. Éxons (E) são indicados com caixas. TAF, (Fator de Ativação Transcricional)

2.8 Polimorfismo SNPs *PvuII* e *XbaI*

Mapas genéticos têm revelado a existência de vários sítios polimórficos no gene do RE α , sendo os mais estudados o *PvuII* (RE α -T397C) e o *XbaI* (RE α -A351G). Estes polimorfismos são analisados pela técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) e sequenciamento. O RFLP *PvuII* detecta a substituição de citosina por timina (C/T) na posição -397 antes do éxon 2 que é referido como T-397int1C, enquanto o RFLP *XbaI* detecta a substituição de guanina por adenina (G/A) na posição -351 antes do éxon 2 que é referido como A-351int1G (Hall e MacDonnell, 1999). Na literatura, o alelo **C** do RE α -397

PvuII é denominado de **P** e o alelo **G** do *ERα-351 XbaI* de **X**, ambos em abstenção de sítios de restrição. O alelo **T** de *ERα-397 PvuII* é denominado de **p** e o alelo **A** de *ERα-351 XbaI* de **x**, ambos apresentando sítios de restrição (Genari et al., 2004) (Tabela 4).

Tabela 4 - Genes de suscetibilidade ao CM e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres sem CM

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

Há duas cópias em cada genoma, portanto existem três possibilidades de combinação entre os alelos: dois de baixo risco; um de baixo risco e outro, de alto risco; e, dois, de alto risco. O risco conferido para cada um destes alelos parece ser alelo **dose-locos dependente** (Easton et al., 2007). Em diferentes estudos, estes polimorfismos têm sido associados com várias condições patológicas, tais como: CM, câncer de próstata, osteoporose, endometriose e doenças cardiovasculares (Massart et al., 2001; Brandi et al., 1999; Tanaka et al., 2003). No entanto, os resultados

ainda são conflitantes e o mecanismo molecular pelos quais esses polimorfismos influenciam a atividade dos receptores não é claro (Genari et al., 2004). *PvuII* e *XbaI* estão localizados no intron 1, área do gene aparentemente não funcional. Há forte ligação de desequilíbrio entre esses dois polimorfismos, pois são separados por apenas 50 pares de bases. Alelos *P* e *X* (ausência de sítios de restrição), tanto quanto alelos *p* e *x* (presença de sítios de restrição) são fortemente associados um com o outro, apesar de haplótipos *pX* não terem sido observados na maioria dos estudos. O haplótipo *Px* foi detectado, embora em baixa frequência, o que indica que o desequilíbrio não é completo.

A partir do estudo de Zuppan et al., 1991, que relacionou polimorfismos do gene do RE e CM de ocorrência após os 50 anos de idade em 11 famílias com vários casos de CM, houve interesse por novas pesquisas. Assim, Andersen et al., 1994, sabendo que polimorfismos em genes do RE poderiam representar biomarcadores para suscetibilidade ao CM, pesquisaram a associação entre eles e encontraram, na população com CM, a presença do genótipo *XbaI* que foi associada com doença tardia ($p=0,033$). Cai et al., 2003^A, também contribuíram para os esclarecimentos acerca dos polimorfismos. Resultados desse estudo, que examinou a associação entre *PvuII* e *XbaI* e o risco de CM, contaram com a participação de 1459 mulheres com o agravo e 1556 controles. Após análises comparativas, verificaram que o polimorfismo *PvuII*-TT e *XbaI*-AA estava associado ao câncer, com OR de 1.4 e 1.3, respectivamente. Da mesma forma, Shin et al., 2003, mostraram associação positiva entre o alelo A do

RE α -351 com maior risco de CM em publicação, no qual OR para mulheres com o genótipo AA foi de 2.38 comparado àquelas com genótipo GG do RE α -351, havendo efeito protetor em portadoras de pelo menos uma cópia do alelo G (OR= 0.4). Nesse mesmo estudo, quando os dados foram estratificados por fatores de risco conhecidos, nuliparidade ou primeira gravidez acima dos 30 anos de idade, o genótipo AA aumentou quatro vezes o risco (OR: 4,0) comparado com mulheres contendo o alelo G e a primeira gravidez antes dos 29 anos de idade. Wedrén et al., 2004, avaliaram polimorfismo do RE α no intron 1 (*PvuII* e *XbaI*) e no éxon 4 (C975→G) e CM, e obtiveram resultados positivos somente na união desses polimorfismos em mulheres obesas com câncer ductal. Haplótipos *XbaI* e C975→G (OR=1,48) apresentaram coincidência com o resultado correspondente ao haplótipo *PvuII* e C975→G (OR=1,59).

Estudando a influência do RE α e terapia hormonal (TH), na DM (fator de risco independente para CM), van Duijnhoven et al., 2006, relataram a associação entre o aumento da DM e a presença do genótipo RE α -397 (OR: 2.24), em mulheres usuárias de TH. Nesse mesmo sentido, Ramos et al., 2009, investigando a distribuição genotípica do polimorfismo *XbaI* em mulheres com mamas densas, verificaram que mulheres com dois alelos mutados (homozigoto mutado) apresentavam 2.5 vezes mais chances de terem mamas densas, quando comparadas àquelas com um ou dois alelos normais para esse polimorfismo (OR = 2.34). Crandall et al., 2009, também associaram DM positivamente a polimorfismos no gene RE α . González-Mancha et al, 2008, analisaram a presença da variante *PvuII* em

444 mulheres com câncer de mama e 704 controles, encontrando na genotipagem significativa representação do alelo T entre os casos com antecedentes familiares de câncer, em comparação com os controles. Desta maneira, a atribuição do polimorfismo *PvuII* foi estatisticamente significativa entre casos de câncer familiar (OR=3.81). Por outro lado, Dunning et al., 2009, em revisão sistemática de estudos caso/ controle notaram que não houve associação significativa entre SNPs *XbaI* e *PvuII* e CM ($p=0.06$ e $p=0.36$ respectivamente), embora tenham ressaltado que a relação entre os SNPs de tais genes e risco de CM poderia ser diferente entre mulheres estratificadas com base em seus níveis estrogênicos e idade, o que não foi considerado pelos autores.

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

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

Genes de suscetibilidade ao CM e frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análises moleculares em mulheres com e sem CM estão enumeradas nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Estudos de associação do polimorfismo do gene do REα-397 PvuII C/T com câncer de mama e/ou com fatores de risco para a doença

Genótipo	Alelo	População	Tipo e tamanho do estudo	Associação	OR / RR	Referências
REα-PvuII 397 T/C	TT	Americana pré e pós menopausa	Somente Casos /Caso controle 257/140	Diagnóstico em mulheres mais jovens		Yaich <i>et al.</i> 1992
	TT	Shangai, chinesa	Caso/controle 1069/1166	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.4 IC 95%: 1.1-1.8 p= 0,042	Cai <i>et al.</i> 2003 ^A
	TT	Holandesa, caucasiana	Caso/controle 380/422	↑ risco para câncer de mama	RR: 1.5 IC 95%: 0.94-2.42	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
	TT	Chinesa 25 a 55 anos	Caso/controle 259/278	↑risco de câncer de mama em mulheres com história familiar positiva	OR: 3.04 IC 95%: 0.73-12.67	Shen <i>et al.</i> 2006
	TT	Espanhola 26 a 86 anos	Caso/controle 444/704	↑ de risco de câncer de mama em mulheres com história familiar positiva	OR: 3.81 IC 95%: 1.25- 11.6	Gonzalez-Mancha <i>et al.</i> 2008
	TT	Holandesa 55 anos ou mais	Caso/controle 190/3513	↑ de risco de câncer de mama em mulheres após a menopausa	OR: 1.4 IC 95%: 0.8-2.2	Ladd <i>et al.</i> 2007
	TT	Americanas peri-menop 42 a 52 anos	Cohort longitudinal 451	↑Maior densidade mamográfica em mulheres brancas	7,0%; p=0,01	Crandall <i>et al.</i> 2009
	TT	Brasileira após menop	Somente casos 308 mulheres	Densidade mamográfica > 50%	TT=32,14% maior que CC=20,13%	Souza <i>et al.</i> 2013A
	TT/TC	Holandesa e inglesa, após menopausa	Populacional Cohort prospectivo Caso/controle (795 com TH/781 sem TH)	↑ Maior densidade mamográfica somente em usuárias de TRH	2.24% p<0.01	van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
	TC	Holandesa	Caso/controle 380/422	↑ risco para câncer de mama	OR: 1.14 IC 95%: 1.00-1.32	Onland-Moret <i>et al.</i> 2005
	TC	Chinesa 25- 55 anos	Caso/controle 259/278	↑ risco para câncer de mama (com história familiar)	OR: 2.46 IC 95%: 0.61-9.88	Shen <i>et al.</i> 2006
	CC	Shangai, chinesa 22-64 anos	Populacional Cohort prospectivo 1459 casos	Expressão RE negativa; pior prognóstico para câncer de mama	OR: 3.30 IC 95%: 1.42-7.69	Boyapatti <i>et al.</i> 2005
	CC	Holandesa e inglesa, após menopausa	Populacional Cohort prospectivo caso/controle (795/781)	Densidade mamográfica sem alterações em usuária de TH	0.90% p= 0.47	van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006

Tabela 6 - Estudos de associação do polimorfismo do gene do REα-351 XbaI A/G com câncer de mama e/ou com fatores de risco a doença

Genótipo	Alelo	População	Tipo e tamanho do estudo	Associação	OR / RR	Referências
REα351 XbaI A/G	AA	Norueguesa 27 a 94 anos	Caso/controle 360/672	↑ risco para câncer de mama após menopausa	OR: 2.02 IC 95%: 0.96-4.31	Andersen <i>et al.</i> 1994
	AA	Koreana	Caso/controle 205/205	↑ risco para câncer de mama	OR: 2.38 IC 95%: 1.58-3.58	Shin <i>et al.</i> 2003
	AA	Koreana	Caso/controle 205/205	↑ risco para câncer de mama em nulíparas	RR: 4.0 IC 95%: 1.9-8.8	Shin <i>et al.</i> 2003
	AA	Holandesa e inglesa, após menopausa	Cohort, prospectivo 791 com TH/ 781 sem TH	↑ densidade mamográfica em usuárias de TH	2,20% p<0,01	van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
	AA	Chinesa		↑ risco para câncer de mama	OR: 6.88 IC 95%: 0.80-59.15 p=0.079	Hu <i>et al.</i> 2007
	AA	Chinesa 25-55 anos	Caso/controle	↑ risco para câncer de mama; com história familiar positiva	OR: 4.20 IC 95%: 0.65-27.28	Shen <i>et al.</i> 2006
	AA	Holandesa, 55 anos ou mais	Caso/controle 190/3513	↑ risco para câncer de mama em mulheres após menopausa	OR: 1.3 IC 95%: 0.7-2.2	Ladd <i>et al.</i> 2007
	AA	Brasileira após menopausa	Prospectivo 120	↑ maior densidade mamária	OR: 2.34 IC95%: 1.06-5.16 p=0.03	Ramos <i>et al.</i> 2009
		Canadense pré menopausa Idade média =48 anos	Populacional observacional 741	Não significativa associação com a densidade mamográfica	p>0.05	Dumas and Diorio. 2010
		Inglesa	Revisão sistemática de estudos caso controle	Diferença não significativa	P=0,06	Dunning <i>et al.</i> 2009
	AA	Paquistanesas, 15-65 anos	Caso/controle 100/100	↑ de risco de câncer de mama após a menopausa	AA 45% maior que GG p<0,01	Javed <i>et al.</i> 2011
	AA	Brasileira, após a menopausa	Somente casos 308 mulheres	Densidade mamografica > 50%	AA 33,44% maior que GG 16,56%	Souza <i>et al.</i> 2013A
		Suecas, após a menopausa	Caso/controle 1556/1512	↑ de risco de Câncer de mama em mulheres após a menopausa e obesas	OR=1,48 IC 95%: 1,17-1,88	Wedren <i>et al.</i> 2004
Haplotipo CC XbaI-C975→G	AG	Norueguesa 27 – 94 anos	Caso/controle 360/672	↑ risco para câncer de mama	OR: 2.00 IC 95%: 0.92-4.37	Andersen <i>et al.</i> 1994
	GG	Americana, caucasiana maior que 65 anos	Caso/controle 393/790	↓ risco para câncer de mama	OR 0.82 IC 95%: 0.68-1.00 P= 0.04	Wang <i>et al.</i> 2007
	GG	Holandesa e inglesa, após menopausa	Cohort prospectivo 795 com TH 781 sem TH	Densidade mamográfica sem alterações em usuária de TRH	0,65% p= 0.70	van Duijnhoven <i>et al.</i> 2006
	A	Chinesa	Caso/controle 114/121	↑risco para câncer de mama	OR: 1.4 IC 95%: 1.0-1.9	Hu <i>et al.</i> 2007
	G	Koreana	Caso/controle 205/205	↓ risco para câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas	RR: 0.3 IC 95%: 0.1-0.5	Shin <i>et al.</i> 2003

2.9 Microssatélite (GT)*n*

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

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

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

Cai et al., em 2003^B, estudaram 1459 mulheres com CM, compararam os resultados com 1556 controles e encontraram forte associação entre o polimorfismo $(GT)_{16}$ a 17 com o câncer de mama (Tabela 7).

Tabela 7- Frequência do alelo polimórfico (GT)_n do RE α em casos de câncer de mama e em controles sadios

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

2.10 Receptor estrogênico

O RE é uma proteína nuclear que apresenta dois tipos: α e β , compostos por 595 e 485 aminoácidos, respectivamente (Figuras 14 e 15). Os receptores apresentam seis regiões funcionais dominantes, com funções específicas (A-F) transcritas por oito éxons (Schor et al., 2004).

FONTE: Klinge, 2000.

Figura 14 - Receptor estrogênico

FONTE: Kumar et al., 2011

Figura 15 - (a) mostra receptor estrogênico ligado ao DNA (complexo com DNA - RE). (b) mostra a estrutura dimensional do REα (à esquerda) e REβ (à direita) ligado ao estradiol

Para o REα, a região A/B é formada pelos aminoácidos de 1 a 180, relaciona-se com NH2 terminal e modula a transcrição, sendo a parte mais imunoativa do receptor. A região C, composta pelos aminoácidos 180-262, contém duas pontes de zinco que medeiam a ligação do receptor aos

hormônios. Esta região se liga ao DNA e apresenta duas sub-regiões CI e CII, compostas pelos aminoácidos de 180 a 215 e 216 a 262, respectivamente; sendo responsáveis pela seletividade e especificidade. A região D, a qual é constituída por aminoácidos de 263 a 302, está envolvida com a interação da proteína hsp90 e com a localização nuclear do receptor. A região E é composta de aminoácidos de 302 a 552, sendo responsável pela eficiência da ligação do receptor ao hormônio, pela dimerização do receptor, pela interação com a proteína hsp90 e pela ativação da transcrição. A região F apresenta COOH terminal e tem ação moduladora específica (Schor et al., 2004).

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

3. Objetivos

Em mulheres após a menopausa propusemo-nos a verificar:

- 1) As características clínicas em relação à densidade mamográfica.
- 2) A associação entre densidade mamográfica e os polimorfismos *XbaI*, *PvuII* e *(GT)_n* do gene do receptor estrogênico alfa.
- 3) A associação entre os resultados moleculares e os fatores de risco clínicos para o câncer de mama.

4. Métodos

Incluíu-se prospectivamente 463 mulheres após a menopausa (308 com mamas densas e 155 com mamas não densas), que foram selecionadas no ambulatório de Ginecologia Endócrina e Climatério e no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de janeiro de 2010 a setembro de 2011. Inicialmente, selecionou-se 3500 mamografias de mulheres com idade de 45 a 65 anos. Após a história clínica, apenas 1200 preenchem os critérios de inclusão e exclusão. As mamografias dessas 1200 mulheres foram, então, avaliadas por um único examinador de forma subjetiva e resultou em 384 mamas densas. Convocaram-se todas as mulheres com mamas densas por telefone para que comparecessem no ambulatório de Ginecologia desse Hospital para nova entrevista, exame físico, coleta de sangue periférico e assinatura de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). Destas, somente 289 compareceram, sendo todas as 289 mamografias avaliadas de forma objetiva: 280 foram classificadas como mamas densas e 9 como não densas por esse método.

No período de maio a setembro de 2011, iniciou-se a seleção do grupo controle (mulheres com mamas não densas) da mesma forma que anteriormente para o grupo de mamas densas: avaliou-se 1300 mamografias no ambulatório de Ginecologia Endócrina e Climatério e no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, dessas 392 pacientes preenchem os critérios de inclusão e exclusão. Também as mamografias dessas mulheres, foram avaliadas de forma subjetiva por um único observador, o que resultou em

174 mamas não densas. Novamente, procedeu-se a convocação dessas mulheres para que comparecessem no ambulatório de Ginecologia Endócrina e Climatério para nova entrevista, exame físico, coleta de sangue periférico e assinatura de consentimento livre e esclarecido. As 174 mamografias foram avaliadas de forma objetiva e 146 foram classificadas como mamas não densas e 28 como mamas densas por esse método. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq (nº 0297/09), Anexo B.

4.1 Critérios de inclusão

Amenorreia por tempo ≥ 1 ano.

Idade entre 45 a 65 anos.

4.2 Critérios de exclusão

Mulheres com câncer de mama ou ovário atual ou anterior.

Resultado na mamografia BI-RADS® 4 ou 5.

Uso de terapia hormonal nos últimos 12 meses.

4.3 Entrevista e exame físico

Na entrevista e exame físico foram avaliados os seguintes fatores de risco para câncer de mama: idade da menarca e menopausa, paridade, idade ao nascimento do primeiro filho, antecedentes familiares de câncer de

mama, hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica e Índice de Massa Corpórea.

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

4.4 Exames subsidiários de análise clínica

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

4.5 Classificação das mamografias

A classificação das mamografias foi determinada segundo critérios do ACR BI-RADS®2003 (Tabela 8).

Tabela 8 - Classificação das Mamografias segundo ACR-BIRADS®

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

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

4.6 Determinação da densidade mamográfica

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

Após essa seleção (triagem), as mamografias foram avaliadas de forma objetiva: As imagens foram digitalizadas no Laboratório de

Qualificação de Imagens Médicas (QualIM) do Departamento de Imagens Médicas da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP utilizando scanner específico para mamografias da Lumisis, modelo *Lumicam 75*, que gera imagens não comprimidas em formato TIFF de 16 bits/pixel. As imagens foram armazenadas em HD externo e posteriormente visualizadas no programa *Imaging J*.

Com esse programa emprega-se, inicialmente, a ferramenta *magic hand tool*, selecionando toda a mama (com cuidado para excluir o músculo peitoral), encontrando, assim, um valor numérico que corresponde à quantidade *pixels* da área mamária geral (Figura 16).

Figura 16 - Seleção da área mamária total pelo programa *Imaging J*

A seguir, selecionou-se com a mesma ferramenta a área mamária mais densa, obtendo-se, dessa forma, a quantidade de *pixels* dessa região (Figura 17).

Figura 17 - Seleção da área mamária de predominância fibroglandular, pelo programa Imaging J

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

$$\text{Densidade Mamográfica} = \frac{\text{Área densa (pixels)} \times 100}{\text{Área total (pixels)}}$$

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

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

Padrões de densidade mamográfica segundo o sistema BI-RADS®

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

4.7 Coleta de material biológico

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

4.7.1 Extração do DNA de sangue periférico

A extração do DNA foi realizada segundo protocolo do kit **DNA blood** (Qiagen). Ao concentrado celular (botão leucocitário) adicionou-se 20

μl de protease (Qiagen) em tubo de 1,5 ml e 200μl de TAL. Agitou-se em vortex (*Scientific Industries*) até que se obteve uma solução homogênea. Seguiu-se a essa etapa incubação a 56°C por 10 minutos. Centrifugou-se brevemente a amostra e adicionou-se 200μl de etanol (96- 100%). Centrifugou-se a amostra brevemente. Aplicou-se a amostra na coluna de 2 ml com nova centrifugação a 8000 rpm/ 1 minuto. Transferiu-se a coluna para novo tubo de coleta de 2 ml e adicionou-se 500μl de TAW1. Centrifugou-se novamente a 8000rpm/1 minuto. Foram colocadas nessa amostra 500μl de TAW2 e centrifugou-se a velocidade máxima por 3 minutos. Transferiu-se a coluna para novo tubo de 2 ml e centrifuga-se a velocidade máxima por 1 minuto. A coluna foi transferida para novo tubo de 1,5 ml e adiciona-se 200μl de H₂O MilliQ, com nova incubação a T ambiente por 5 minutos para aumentar o rendimento de DNA recuperado. Finalmente centrifugou-se a 8000 rpm/ 1 minuto e armazenou a amostra a -20°C.

4.7.2 Quantificação do DNA

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

Figura 18 - Gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídio apresentando o perfil do DNA genômico

4.7.4 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Para análise do polimorfismo presente no *íntron* 1 do gene RE α , os produtos de PCR foram incubados em volume final de 20 μ l a 37°C por 4 horas, contendo 3UN *PvuII* e 3UN *XbaI* (Life Technologies, Carlsbad, California, U.S), 2 μ l do “React 2 Buffer”, 0,2 uL de BSA (albumina sérica bovina) e 17,3 μ l do produto do PCR (Figura 19).

A enzima de restrição *PvuII* reconhece o seguinte trecho da sequência da PCR amplificado para este trecho do gene RE α :

5'...CAG $\uparrow$ CTG...3'/3'...GTC $\downarrow$ GAC...5'.

Já a enzima *XbaI* reconhece o trecho da sequência da PCR amplificado para este trecho do gene RE α :

5'...T $\uparrow$ CTAGA...3'/3'...AGATC $\downarrow$ T...5'.

Figura 19 - Gel agarose impregnado com brometo de etídeo apresentando os fragmentos de PCR referentes ao *íntron* 1 do receptor de estrogênio alfa. A seta contínua mostra a migração em 1.3 Kb do fragmento íntegro (S); a seta menor a migração em ~900pb e a seta pontilhada a migração em ~400 pb. O primeiro fragmento mostra RE α , o segundo obtido com digestão por *PvuII* e o terceiro o fragmento obtido por digestão com *XbaI*.

4.7.5 Determinação dos microssatélites (GT)*n*

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

A figura 20 ilustra o primer da região promotora contendo as repetições de dinucleotídeo (GT)*n* do gene do REα.

The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR tool interface in a Mozilla Firefox browser. The address bar displays the URL: `genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgslid=222780351&org=Human&db=hg19&wp_target=genome&wp_f=GTGTCTGCTCAAATCTCTCTG&wp_r=GTAAAGAGGGCCTTTAC`. The tool has identified a 138bp region on chromosome 6 (chr6:152122095+152122232) with the sequence: `GTGTCTGCTCAAATCTCTCTG GTTAAGAGGGCCTTTAC`. The primer melting temperatures are calculated as follows:

Direction	Sequence	Temperature (°C)
Forward	59.1 C	gtgtctgtctcaaatctctctg
Reverse	49.0 C	gttaagaaggcctttac

A note at the bottom states: "The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#)."

Figura 20 - Primer da região promotora contendo os tandem repeats GT do gene do REα

4.7.5.1 Reação de sequenciamento

Conforme instruções do fabricante para o sequenciamento em *ABI PRISM 3500* (Life Technologies), o mix da reação foi preparado de acordo com a análise quantitativa das bandas encontradas em gel de agarose. Foram realizadas duas reações para cada fragmento analisado, uma para a fita senso e outra para a fita anti-senso, a fim de cobrir toda a área de

interesse e confirmar o resultado através da comparação das duas fitas, que foram complementares por toda a extensão do fragmento em questão. As amostras utilizadas apresentam bandas com massa em torno de 100 ng de DNA. Para o oligonucleotídeo iniciador, a concentração final foi de 5 pmol/ μ l. O pre-mix, contendo os demais reagentes da reação, provém do kit *Big Dye Terminator Chemistry (Life Technologies)*. O volume final, nesse caso 10 μ l, foi completado com água ultrapura (livre de RNAses e DNAses). Dentre os dNTPs utilizados, alguns são marcados com um agente fluoróforo e possuem uma hidroxila a menos no carbono 3 da molécula, sendo, portanto, chamados de dideoxinucleotídeos. Isto faz com que a extensão da fita seja interrompida quando estes são incorporados e seja emitida uma fluorescência característica, que vai ser capturada pelo aparelho sequenciador. A reação foi levada ao termociclador e submetida a uma desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto e 35 ciclos de variação de temperatura, permanecendo por 15 segundos a 95°C para a desnaturação das fitas do DNA, 5 segundos a 55°C para o anelamento do oligonucleotídeo iniciador, 4 minutos a 60°C para que a enzima possa realizar a extensão das fitas e, por tempo indeterminado, a 4°C, interrompendo a reação.

4.7.5.2 Precipitação e purificação do produto da reação de sequenciamento com “Isopropanol”

Adicionou-se uma solução contendo 60 μ L de etanol absoluto e 5 μ L de EDTA 125mM em cada poço, vortexou-se por 30 segundos e em seguida a placa ficou incubada em temperatura ambiente, protegida da luz, por 15

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

As reações de sequenciamento foram feitas em placas de 96 poços, uma vez que a separação dos fragmentos gerados foi feita por eletroforese capilar no aparelho *ABI PRISM 3500 (Life Technologies)*, que capta o sinal fluorescente dos dideoxinucleotídeos e fornece o resultado na forma de picos de fluorescência. Para verificar a qualidade das sequências obtidas após a eletroforese, utilizou-se o software *BioEdit v7.1.3 (Ibis Biosciences)* (Figura 21).

Figura 21 - Gráfico representativo do sequenciamento gênico da região promotora do receptor estrogênico alfa. No painel superior, é possível observar a região de repetição (GT)_n amplificada pelo iniciador senso. No painel inferior, a região amplificada pelo iniciador antissenso

4.7.6 Controles internos do PCR

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

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

4.7.7 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

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

4.7.8 Distribuição dos Haplótipos

A distribuição dos haplótipos foi feita para verificar se a população em estudo está em desequilíbrio de ligação, o qual foi determinado pelas medidas (r^2 e D'), o que permite verificar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs *PvuII* e *XbaI*. Haplótipos referem-se à combinação de alelos de diferentes polimorfismos que estão em proximidade no mesmo cromossomo. Podem, portanto, ser transmitidos juntos. Para que haja essa transmissão, o polimorfismo tem que estar em desequilíbrio de ligação, o qual acontece quando o mesmo haplótipo ocorre mais frequentemente que o esperado ao acaso, ou seja, esses marcadores encontram-se ligados, formando blocos (Figura 22). O desequilíbrio entre os SNPs pode ser avaliado por D' . Onde D' varia de 0 (não desequilíbrio) a 1 (total desequilíbrio) (Pharoah et al., 2004).

Considerando um par de alelos no *locus* 1, A e a , e no *locus* 2, B e b , com as respectivas frequências p_A , p_a , p_B e p_b , as probabilidades de encontrar os alelos destes dois *loci* juntos, no mesmo cromossomo, são: p_{AB} , p_{Ab} , p_{aB} e p_{ab} . Se estiverem em equilíbrio de ligação, os alelos do *locus* 2 (B e b) são independentes dos alelos do *locus* 1 (A e a), ou seja, $p_{AB} = p_A p_B$. Uma medida direta de medir o desequilíbrio de ligação (D) é por meio da diferença entre as frequências alélicas p_{AB} e $p_A p_B$, ou seja, $D = \frac{p_{AB} - p_A p_B}{\max(p_A p_B, p_A p_b, p_a p_B, p_a p_b)}$.

Uma série de estatísticas tem sido usadas para medir o desequilíbrio de ligação, sendo que todas têm como componente básico a diferença entre

as frequências alélicas observada e esperada (D_{ab}). As duas estatísticas mais usadas para mensurar o desequilíbrio de ligação são r^2 e D' (Flint-Garcia et al., 2003).

A estatística r^2 , também descrita na literatura como D^2 , é a correlação ao quadrado entre a presença e a ausência de alelos em diferentes *loci* (Hill e Robertson, 1968):

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

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

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

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

FONTE: Ding S et al., 2010.

Figura 22 - Diagramas esquemáticos de REα e o gene do receptor estrogênico 1 (ESR1). A) domínios funcionais REα. B) estrutura do éxon do ESR1. Os comprimentos das caixas de luz azul (éxons) e linhas pretas (íntrons) são proporcionais ao tamanho (isto é, pares de base) do éxons ou íntrons, no entanto, para refletir a relação entre as regiões exônicas (B) e seus domínios correspondentes (A), as escalas para os éxons e íntrons são diferentes. C) SNPs de ESR1 associados com o risco de câncer de mama; SNPs mostrando um efeito significativo ($P < 0,05$) são mostrados em vermelho, e aqueles mostrando um efeito marginal ($0,05 \leq P < 0,10$) são na cor laranja. D) DL entre os SNPs genotipados de ESR1 em mulheres de controle de Taiwan. A força do DL entre SNPs, como indicado pelo esquema de cores, foi medida usando uma combinação de a estatística D pontuação (sombreado vermelho escuro $D' = 1$; luz vermelha sombreado $D' < 1$)

4.8 Método Estatístico

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

Para determinar a relação da classificação subjetiva com a classificação objetiva (*gold standard*) foi utilizado o teste de Kappa e calculou-se a sensibilidade (capacidade da classificação subjetiva identificar os verdadeiros positivos), a especificidade (capacidade da classificação subjetiva identificar os verdadeiros negativos), e a acurácia (capacidade total de classificação correta da classificação subjetiva).

Para verificar a associação entre as variáveis qualitativas com a ocorrência de mama densa foi utilizado o teste do qui-quadrado.

Para comparação entre os grupos de mama densa e não densa quanto as variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados, como estes não apresentaram distribuição normal em todos os grupos utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os grupos.

Para verificar a relação das variáveis estudadas com a ocorrência de mama densa utilizou-se de Regressão Logística Multivariada modelo *stepwise backward*. As variáveis que entraram no modelo foram as que apresentaram nas análises bivariadas valores $p < 0,20$.

Em todos os testes estatísticos adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Caracterização da densidade mamográfica

A distribuição da densidade mamográfica, de acordo com os dois observadores, ficou assim determinada como mostra a tabela 9 e figura 23. Das 463 mamografias, o observador objetivo classificou como densa 308 e não densa 155; enquanto o observador subjetivo classificou 289 como densa e 174 não densa, com alto grau de concordância de 92%.

Tabela 9 - Distribuição da densidade mamográfica em 463 mulheres após a menopausa, determinada por dois observadores independentes Mamas densas (tecido fibroglandular ocupa acima de 50% da área total da mama).
Observador 1- avaliação subjetiva.
Observador 2- avaliação objetiva.

Avaliação subjetiva	Avaliação objetiva		Total
	Não densa	Densa	
Não densa	146	28	174
	31,5%	6,1%	37,6%
Densa	9	280	289
	1,9%	60,5%	62,4%
Total	155	308	463
	33,5%	66,5%	100,0%

Sensibilidade = 90,9%

Especificidade = 94,2%

Acurácia = 92,0%

Figura 23 - Grafico com a distribuição da densidade mamográfica de 463 mulheres após a menopausa, determinada por dois observadores independente

Como foi encontrado alto grau de concordância entre os dois observadores, os valores de densidade utilizados como referência para as análises posteriores foram aqueles determinados pelo observador objetivo (tabela 10), por não serem tendenciosos.

Tabela 10 - Distribuição dos padrões de densidade mamografica na população estudada de acordo com o observador objetivo

Mama densa	n	%
Não	155	33,5%
Sim	308	66,5%
Total	463	100,0%

5.2 Associação entre as Características Clínicas e a Densidade Mamográfica

A série foi composta por 463 mulheres, após a menopausa que preencheram os critérios de inclusão. Suas características clínicas foram analisadas e estão resumidas nas tabelas 11 (variáveis quantitativas) e 12 (variáveis qualitativas).

Tabela 11 – Comparação entre os grupos de mama densa e não densa nas variáveis quantitativas

Medida	Não densa		Densa		dif.	p	OR
	média	dp	média	dp			
Idade	58,16	4,61	56,31	5,42	-1,86	0,001	0,93 (0,90-0,97)
CA	95,06	11,13	89,47	10,83	-5,59	<0,001*	0,96 (0,94-0,97)
N. Gravidez	3,63	2,56	2,46	1,83	-1,16	<0,001*	0,78 (0,71-0,86)
N. Parto	2,84	1,98	1,99	1,54	-0,85	<0,001*	0,75 (0,67-0,85)
N. Aborto	0,79	1,20	0,48	0,87	-0,31	0,003	0,74 (0,61-0,90)
DUP	29,95	5,92	30,27	5,75	0,32	0,429	1,01 (0,97-1,05)
DUM	46,83	6,26	46,45	6,33	-0,38	0,621	0,99 (0,96-1,02)
I. 1o. Filho	21,88	5,16	24,04	6,04	2,17	<0,001*	1,07 (1,03-1,12)
Menarca	12,87	1,78	13,17	1,78	0,30	0,096	1,10 (0,99-1,23)
Tempo pós DUM	11,33	6,42	9,85	7,38	-1,48	0,007*	0,97 (0,95-0,99)

* - diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Teste não paramétrico de Mann-Whitney

DUP- data do último parto

DUM- data da última menstruação

Tabela 12 - Descrição das variáveis qualitativas

Característica		Densidade mamográfica	n	%	χ^2	p
Cor da pele	Branca	Densa	180	68,4	4,71	0,194
		Não densa	83	31,6		
	Parda	Densa	67	60,4		
		Não densa	44	39,6		
	Preta	Densa	46	64,8		
		Não densa	25	35,2		
	Amarela	Densa	15	83,3		
		Não densa	3	16,7		
Índice de Massa Corpórea (IMC)	Normal/sobrepeso	Densa	195	63,3	5,23	0,022*
		Não densa	81	52,3		
	Obeso	Densa	113	36,7		
		Não densa	74	47,7		
Fumo	Não	Densa	264	85,7	1,97	0,161
		Não densa	140	90,3		
	Sim	Densa	44	14,3		
		Não densa	15	9,7		
Álcool	Não	Densa	258	83,8	1,76	0,185
		Não densa	137	88,4		
	Sim	Densa	50	16,2		
		Não densa	18	11,6		
Síndrome metabólica	Não	Densa	220	71,4	0,92	0,337
		Não densa	104	67,1		
	Sim	Densa	88	28,6		
		Não densa	51	32,9		

* - diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Teste do qui-quadrado

Foram observadas diferenças significantes entre os grupos densa e não densa em relação a Idade ($z=3,40$; $p=0,001$); Cintura Abdominal ($z=5,04$; $p<0,001$); número de gravidezes ($z=4,62$, $p<0,001$); Idade ao nascimento do primeiro filho ($z=3,61$, $p<0,001$), Tempo decorrido deste a DUM ($z=2,69$, $p=0,007$) e IMC ($\chi^2=5,22$; $p<0,022$).

Idade

Em relação a idade, obteve-se “Odds Ratio” $OR=0,93$ e $IC95\%=0,88-0,99$; $p=0,005$. Observou-se que para cada ano a mais na idade, a probabilidade de ser classificada como mama densa diminui em 6,8%.

Cintura abdominal (CA)

Verificamos que maior medida de CA atuou com fator de proteção para ocorrência de mama densa, com o valor de $OR=0,96$ e $IC95\%=0,94-0,98$; $p=0,001$. A cada unidade a mais na CA o risco diminui em 4,4%.

Número de gravidezes

Foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação a número de gravidezes, $p=0,007$; $OR=0,83$ e $IC95\%=0,72-0,95$. A cada gravidez a mais o risco de ter mama densa diminui em 17%.

Idade ao nascimento do primeiro filho

Idade ao ter o primeiro filho atuou como fator de influência positiva para ocorrência de mama densa. $OR=1,05$ e $IC95\%=1,004-1,106$; $p=0,035$. Verificamos para mamas densas, média etária de 24,04 anos e para as não densas, 21,88 anos. Cada ano de atraso na primeira gravidez de termo o risco aumenta em 5,3%.

Antecedentes Familiares

Os valores obtidos na associação, densidade mamográfica e antecedentes familiares com CM, mostraram que a chance de ter mama densa é 2,02 vezes maior para quem tem esse fator de risco. OR=2,028 e IC95%=1,052-3,909; p=0,035.

Tempo decorrido desde a DUM

O tempo decorrido da DUM influenciou o padrão da densidade mamária. Quanto maior o tempo decorrido da DUM maior a chance de ser classificada como mama não densa.

Índice de Massa Corpórea (IMC)

Ao correlacionar IMC e padrão de densidade mamográfica, observou-se associação inversa entre obesidade e padrão de alta densidade (Tabela 13)

Tabela 13 - Regressão logística, tendo como variável dependente Mama Densa e variável independente IMC

Índice de Massa Corpórea (IMC)	Normal/sobrepeso	Densa	195	70,7	p = 0,022*	OR=0,63 IC=0,43-0,94
		Não densa	81	29,3		
	Obeso	Densa	113	60,4		
		Não densa	74	39,6		

5.3 Associação dos Polimorfismos e Densidade mamográfica

5.3.1 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

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

Conforme são apresentados na tabela 14, os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* encontram-se em equilíbrio de H-W na população em questão ($p>0,05$).

Tabela 14 - Distribuição dos polimorfismos com verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismo	Observado		Esperado		Equilíbrio de H-W
	n	%	n	%	
<i>pp</i>	131	29,0	128	28,31	0,566 ns
<i>Pvull</i> <i>Pp</i>	219	48,5	225	49,79	
<i>PP</i>	102	22,6	99	21,89	
Freq Alélica <i>p</i>	481	53,21			
Freq Alélica <i>P</i>	423	46,79			
<i>xx</i>	143	31,6	146	32,33	0,549 ns
<i>Xbal</i> <i>Xx</i>	228	50,4	221	49,06	
<i>XX</i>	81	17,9	84	18,61	
Freq Alélica <i>x</i>	514	56,86			
Freq Alélica <i>X</i>	390	43,14			

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

5.3.2 Distribuição dos genótipos

Polimorfismo *Pvull*

Foi verificada diferença significativa entre os grupos de mama densa e não densa apenas para a distribuição dos genótipos do polimorfismo *Pvull* (tabela 15).

Tabela 15 - Associação entre o tipo da mama e polimorfismo *PvuII*

Mama Densa	<i>PvuII</i>			Total
	Pp	pp	PP	
Não	72	31	41	144
	50,0%	21,5%	28,5%	100,0%
Sim	147	100	61	308
	47,7%	32,5%	19,8%	100,0%
Total	219	131	102	452
	48,5%	29,0%	22,6%	100,0%

$\chi^2=7,42$; $p = 0,024$ * ; OR=1,75; IC95%=1,10- 2,79

Polimorfismo *XbaI*

Não foi observado diferença significativa entre os dois grupos de densidade mamográfica para a distribuição dos genótipos do polimorfismo *XbaI* (tabela 16).

Tabela 16 - Associação entre o tipo da mama e polimorfismo *XbaI*

Mama Densa	<i>XbaI</i>			Total
	Xx	xx	XX	
Não	74	40	30	144
	51,4%	27,8%	20,8%	100,0%
Sim	154	103	51	308
	50,0%	33,4%	16,6%	100,0%
Total	228	143	81	452
	50,4%	31,6%	17,9%	100,0%

$\chi^2=2,03$; $p = 0,362$ ns, OR=1,31; IC95%= 0,85 – 2,02

Polimorfismo de Repetição (GT)n

Distribuição do polimorfismo de repetição (GT)n entre os grupos de mama densa e não densa (tabela 17). A amostra foi dividida baseando-se na média, que foi de 15 repetições.

Não houve diferença significativa entre o polimorfismo de repetição (GT)n e o padrão de densidade mamária, porém observamos que quanto maior o número de repetições maior chance de se ter mama densa (OR=1,34).

Tabela 17 - Associação entre o tipo de mama e polimorfismos de repetição (GT)n

	GT(n)		Total
	≤15	>15	
Mama Densa			
	74	70	144
	51,4%	48,6%	100,0%
Não			
	136	172	308
	44,2%	55,8%	100,0%
Sim			
	210	242	452
	46,5%	53,5%	100,0%
Total			

$\chi^2 = 2,06$; $p = 0,151$; OR = 1,34; IC95%=0,90 – 1,99

5.3.3 Distribuição dos alelos

Verificamos que para a distribuição alélica obtivemos diferença estatística apenas para o polimorfismo *PvuII* ($\chi^2=7,58$; $p= 0,006$; OR=1,58; 95%IC=1,12-1,96), como demonstrado na tabela 18.

Tabela 18 - Distribuição alélica dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* entre os grupos de densidade mamográfica e resultados referentes ao teste de Qui-Quadrado

Polimorfismos	Densidade mamográfica	n	%	χ^2	p	OR 95%IC
Freq. Alélica p	Densa	347	56,3	7,58	0,006*	1,58(1,12-1,96)
	Não densa	134	46,5			
Freq. Alélica P	Densa	269	43,7	1,98	0,160ns	1,22(0,92-1,62)
	Não densa	154	53,5			
Freq. Alélica x	Densa	360	58,4	1,98	0,160ns	1,22(0,92-1,62)
	Não densa	154	53,5			
Freq. Alélica X	Densa	256	41,6	1,98	0,160ns	1,22(0,92-1,62)
	Não densa	134	46,5			

5.3.4 Distribuição dos haplótipos

A distribuição dos haplótipos foi feita para verificar se a população em estudo está em equilíbrio de ligação, o qual foi determinado pelas medidas (r^2 e D'), o que permite verificar o equilíbrio de ligação entre os SNPs *PvuII* e *XbaI*. Haplótipos referem-se à combinação de alelos de diferentes polimorfismos que estão em proximidade no mesmo cromossomo. Podem, portanto, ser transmitidos juntos. Para que haja essa transmissão, o polimorfismo tem que estar em equilíbrio de ligação, o qual acontece quando o mesmo haplótipo ocorre mais frequentemente que o esperado ao acaso, ou seja, esses marcadores encontram-se ligados, formando blocos. O equilíbrio entre os SNPs pode ser avaliado por D' . Onde D' varia de 0 (não equilíbrio) a 1 (total equilíbrio) (Pharoah et al., 2004).

Considerando um par de alelos no *locus* 1, *A* e *a*, e no *locus* 2, *B* e *b*, com as respectivas frequências p_A , p_a , p_B e p_b , as probabilidades de encontrar os alelos destes dois *loci* juntos, no mesmo cromossomo, são: p_{AB} , p_{Ab} , p_{aB} e p_{ab} . Se estiverem em equilíbrio de ligação, os alelos do *locus* 2 (*B* e *b*) são independentes dos alelos do *locus* 1 (*A* e *a*), ou seja, $p_{AB} = p_A p_B$. Uma medida direta de medir o desequilíbrio de ligação (D) é por meio da diferença entre as frequências alélicas p_{AB} e $p_A p_B$, ou seja, $D = p_{AB} - p_A p_B$.

Uma série de estatísticas tem sido usadas para medir o desequilíbrio de ligação, sendo que todas têm como componente básico a diferença entre as frequências alélicas observada e esperada (D_{ab}). As duas estatísticas mais usadas para mensurar o desequilíbrio de ligação são r^2 e D' (Flint-Garcia et al., 2003).

A estatística r^2 , também descrita na literatura como D^2 , é a correlação ao quadrado entre a presença e a ausência de alelos em diferentes *loci* (Hill e Robertson, 1968):

$$r^2 = \frac{(D_{ab})^2}{p_A p_a p_B p_b}$$

$$[D'] = \frac{(D_{ab})^2}{\min(p_A p_a p_B p_b)}, \text{ se } D_{ab} < 0;$$

$$[D'] = \frac{(D_{ab})^2}{\min(p_A p_a p_B p_b)}, \text{ se } D_{ab} > 0;$$

O valor absoluto $|D'|$ varia de 0 a 1. Somente quando forem observados todos os quatro possíveis haplótipos (p_{AB} , p_{Ab} , p_{aB} e p_{ab}) é que D' será inferior a 1. Nesse caso, consequentemente, um suposto evento

de recombinação terá ocorrido entre os dois *loci*. Sempre que uma das quatro frequências haplotípicas for zero, $|D'|$ será igual a 1, o que ocorre com frequência, quando se trabalha com populações pequenas (Wray e Visscher, 2008).

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

Mama densa

$$PvuII \times XbaI \rightarrow D' = 39,61\%$$

$$r^2 = 0,14$$

Mama não densa

$$PvuII \times XbaI \rightarrow D' = 39,74\%$$

$$r^2 = 0,12$$

Definição e frequência obtida no presente estudo:

A distribuição dos haplótipos está apresentada na tabela 19.

Tabela 19 - Frequência dos haplótipos *PvuII* x *XbaI*

Mama Densa	<i>PX</i>		<i>Px</i>		<i>pX</i>		<i>px</i>		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Não	94	65,28	19	13,19	10	6,94	21	14,58	144	100
Sim	167	54,22	41	13,31	38	12,34	62	20,13	308	100

diferença estatisticamente significativa $p = 0,156$ ns

5.4 Regressão Logística Multivariada

Das características clínicas analisadas, apenas entraram no modelo as que apresentaram análises bivariadas valores $p < 0,20$. Os resultados apresentados são provenientes de Regressão Logística Multivariada modelo *stepwise backward*, (tabela 20).

Tabela 20 - Regressão logística múltipla, método *stepwise backward*, tendo como variável dependente Mama Densa e variáveis independentes: Idade, DUM, Tempo após DUM, Raça, CA, IMC, Numero de Gravidez, Número de Partos, Número de Abortos, Idade do 10. filho, Menarca, Tabagismo, Álcool, AF e Pvu II mutado

Variáveis independentes	B	Erro padrão B	OR	OR (IC95%)		p
Constante	7,330	1,715				
Idade	-0,070	0,025	0,932	0,888	0,979	0,005
CA	-0,038	0,011	0,963	0,943	0,984	0,001
Núm. de Gravidez	-0,186	0,069	0,830	0,725	0,950	0,007
Idade 1ºFilho	0,052	0,025	1,053	1,004	1,106	0,035
AF	0,707	0,335	2,028	1,052	3,909	0,035
Pvu II mutado	0,562	0,290	1,754	0,993	3,099	0,053

Considerando as variáveis que mostraram associação com a densidade mamográfica : idade, tempo após DUM, CA, IMC, número de gravidezes, idade ao ter o 1º. filho, antecedentes familiares com câncer de

mama e polimorfismo do gene RE α -Pvu II mutado, após realização de regressão logística múltipla apenas idade, cintura abdominal, número de gravidezes, idade ao ter o primeiro filho, antecedentes familiares com câncer de mama e genótipo PvuII mutado), foram consideradas fatores de risco independentes (tabela 20).

5.5 Associação entre tipo de mama e exames laboratoriais de análise clínica

Na tabela 21, observa-se maiores concentrações de estradiol e IGF1 em mulheres com mama densas, porém sem significância estatística.

Tabela 21 - Descrição das variáveis quantitativas (laboratoriais de análise clínica)

Medida	Não densa		Densa		dif.	P
	média	dp	média	dp		
Insulina	12,35	7,47	9,41	7,23	-2,94	<0,001*
IGF1	128,60	48,72	140,07	72,70	11,47	0,078
E2	16,13	6,43	18,75	19,69	2,61	0,109
T4	9,53	1,65	9,59	2,24	0,06	0,754
T4L	1,07	0,19	1,16	0,88	0,09	0,202
T3	142,08	23,10	135,40	24,04	-6,69	0,004*

* - diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

5.6 Associação entre os polimorfismos *PvuII*, *XbaI*, *(GT)_n* e as características clínicas

Análises adicionais foram realizadas para avaliar a associação entre os polimorfismos do gene do RE α e indicadores de exposição ao estrógeno endógeno. Estes indicadores incluíram: tempo após a data da última menstruação, cintura abdominal, índice de massa corpórea, número de gravidezes, data da última menstruação, idade ao ter o primeiro filho e menarca. Pode se observar na tabela 22 que apenas o polimorfismo *PvuII* associou-se ao número de gravidezes. Na presença de homozigose mutado (pp) menor o número de gravidezes.

Tabela 22 - Associação entre os grupos de polimorfismos *PvuII*, *XbaI*, (GT)*n* e as características clínicas estudadas

Medidas		<i>PvuII</i>		<i>XbaI</i>		(GT) <i>n</i>	
		PP + Pp	pp	XX + Xx	xx	GT ≤15	GT >15
Tempo pós DUM	média	10,67	9,69	10,56	10,01	9,97	10,74
	dp	7,20	6,96	7,05	7,32	6,77	7,43
	p	0,203		0,348		0,348	
CA	média	91,69	90,24	90,85	92,19	91,26	91,29
	dp	11,25	11,34	11,20	11,44	10,67	11,81
	p	0,221		0,316		0,316	
IMC	média	28,27	27,42	27,86	28,38	27,97	28,07
	dp	5,38	5,35	5,28	5,60	4,90	5,77
	p	0,127		0,358		0,358	
N. Gravidez	média	3,02	2,43	3,00	2,52	3,02	2,70
	dp	2,33	1,75	2,26	2,02	2,28	2,11
	p	0,046*		0,051		0,051	
N. Aborto	média	0,63	0,47	0,65	0,44	0,60	0,57
	dp	1,10	0,76	1,11	0,74	1,08	0,95
	p	0,488		0,152		0,152	
DUM	média	46,56	46,46	46,45	46,71	46,71	46,38
	dp	6,50	5,94	6,41	6,18	6,15	6,50
	p	0,580		0,717		0,717	
I. 1o. Filho	média	22,99	24,09	23,28	23,32	23,06	23,51
	dp	5,74	6,21	5,86	5,97	5,58	6,16
	p	0,122		0,952		0,952	
Menarca	média	13,04	13,18	13,11	13,01	13,20	12,98
	dp	1,74	1,85	1,83	1,66	1,85	1,70
	p	0,582		0,719		0,719	

* - diferença estatisticamente significante (p<0,05)

5.7 Frequência *REα-397 PvuII* C/T neste e em outros estudos

As frequências alélicas e genotípicas obtidas para o polimorfismo *REα-397-PvuII* (P=46,8%; p=53,2%) foram semelhantes às encontradas em

outros estudos que correlacionaram este polimorfismo com DM ou CM (tabela 23).

Tabela 23 - Frequência *REα-397 Pvull* C/T neste e em outros estudos

Frequência genotípica			Frequência alélica				País	Referências
<i>pp</i> - n(%)	<i>Pp</i> - n(%)	<i>PP</i> -n (%)	<i>p</i> (%)	<i>P</i> (%)	n	p-value		
131 (29,0)	219 (48,5)	102 (22,6)	0,53	0,47	452	0,024	Brasil	Este estudo
242 (32.3)	356 (47.5)	152 (20.2)	0.56	0.44	750		Brasil	Giacomazzi 2008
64 (32.8)	105 (53.9)	26 (13.3)	0.59	0.41	195	0.07	Korea	Shin et al. 2003
61 (40.7)	61 (40.7)	28 (18.6)	0.61	0.39	150	0.13	Shangai	Shen et al. 2006
88 (21.0)	153 (36.4)	96 (22.9)	0.49	0.51	337	<0.001	Denmark	Onland-Moret et al. 2005
208 (26.8)	402 (51.8)	166 (21.4)	0.53	0.47	776	<0.001	Holand	van Duijnhoven et al. 2006
207 (26.7)	385 (49.7)	183 (23.6)	0.51	0.49	775	<0.001	Holand	van Duijnhoven et al. 2006
21 (32.8)	32 (40.7)	11 (17.2)	0.58	0.42	64	0.10	Poland	Jakimiuk et al. 2007
49 (43.4)	45 (39.8)	19 (16.8)	0.64	0.36	113	<0.001	China	Hu et al. 2007
27 (24.1)	68 (40.7)	17 (15.2)	0.54	0.46	112	<0.001	China	Hsieh et al. 2007
60 (54.5)	44 (40.7)	6 (5.5)	0.75	0.25	110	0.08	China	Hsieh et al. 2007
25 (23.6)	75 (70.8)	6 (5.6)	0.59	0.41	106	<0.001	China	Hsieh et al. 2007
29 (26.4)	50 (45.4)	31 (28.2)	0.51	0.49	110	<0.001	Hungary	Molvarec et al. 2007
45 (25.0)	94 (52.2)	41 (22.8)	0.51	0.49	180	<0.001	Hungary	Molvarec et al. 2007
16 (28.6)	28 (50.0)	12 (21,4)	0.54	0.46	56	0.02	Hungary	Molvarec et al. 2007
7 (33.3)	8 (38.1)	6 (28.6)	0.52	0.48	21	0.07	Hungary	Molvarec et al. 2007
3 (27.3)	7 (63.6)	1 (9.1)	0.59	0.41	11	0.51	Hungary	Molvarec et al. 2007

5.8 Frequência *REα-351 XbaI* A/G neste e em outros estudos

As frequências alélicas para o polimorfismo *XbaI* ($x = 56,9\%$; $X = 43,1\%$), porém foram menores quando comparadas com outros dois estudos

realizados na população brasileira (Ramos et al., 2009; Giacomazzi et al., 2008), mas estiveram de acordo com a frequência encontrada por van Duijnhoven et al. (2006), por Molvarec et al. (2007) e Hsieh et al. (2007) (Tabela 24).

Tabela 24 - Frequência do REα-351 XbaI A/G neste e em outros estudos

Frequência genotípica			Frequência alélica				p-value	País	Referências
xx- n(%)	Xx- n(%)	XX-n (%)	x (%)	X (%)	n				
143 (31,6)	228 (50,4)	81 (17,9)	0,57	0,43	452	0,3		Brasil	Este estudo
347 (46.3)	313 (41.7)	90 (12.0)	0.67	0.33	750			Brasil	Giacomazzi 2008
21 (17,5)	45 (37,5)	54 (45,0)	0,64	0,36	120	0,18		Brasil	Ramos et al. 2009
86 (44.1)	102 (52.3)	7 (3.6)	0.70	0.30	195	0.001		Korea	Shin et al. 2003
92 (61.4)	47 (31.3)	11 (7.3)	0.77	0.33	150	0.003		Shangai	Shen et al. 2006
123 (29.3)	151 (36.0)	61 (14.5)	0.60	0.40	335	0.003		Denmark	Onland-Moret et al. 2005
41 (32.0)	362 (46.4)	98 (12.6)	0.56	0.44	780	0.02		Holand	van Duijnhoven et al. 2006
308 (39.7)	371 (47.9)	96 (12.4)	0.64	0.36	775	0.007		Holand	van Duijnhoven et al. 2006
38 (59.4)	22 (34.4)	4 (6.25)	0.77	0.33	64	0.10		Poland	Jakimiuk et al. 2007
68 (61.8)	35 (31.8)	7 (6.4)	0.77	0.33	110	0.007		China	Hu et al. 2007
30 (26.8)	64 (57.1)	18 (16.1)	0.55	0.45	112	0.001		China	Hsieh et al. 2007
37 (33.6)	71 (64.6)	2 (1.8)	0.66	0.34	220	<0.001		China	Hsieh et al. 2007
21 (19.8)	56 (52.8)	29 (27.4)	0.59	0.41	106	<0.001		China	Hsieh et al. 2007
15 (24.6)	31 (50.8)	15 (24.6)	0.50	0.50	61	0.001		Hungary	Molvarec et al. 2007
23 (39.7)	31 (53.4)	4 (6.9)	0.66	0.34	58	0.18		Hungary	Molvarec et al. 2007
41 (37.3)	47 (42.7)	22 (20.0)	0.59	0.41	110	0.04		Hungary	Molvarec et al. 2007
60 (33.3)	93 (51.7)	27 (15.0)	0.59	0.41	180	0.007		Hungary	Molvarec et al. 2007
19 (33.9)	29 (51.8)	8 (14.3)	0.60	0.40	56	0.20		Hungary	Molvarec et al. 2007
7 (33.3)	10 (47.6)	4 (19.1)	0.57	0.43	21	0.42		Hungary	Molvarec et al. 2007
4 (36.4)	6 (54.5)	1 (9.1)	0.36	0.36	11	0.69		Hungary	Molvarec et al. 2007

6. Discussão

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

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

Acredita-se que o padrão mamográfico seja multifatorial e sofra influência da idade, fatores reprodutivos, idade da menarca, estado menopausal, antecedente familiar, hábito alimentar, sedentarismo, terapia hormonal e ingestão alcoólica excessiva. Estes fatores, porém, explicam somente 20 a 30% das variações da DM (Boyd et al., 2010). Estudos em gêmeos monozigóticos demonstram que a hereditariedade resulta em 60% da DM (Martin et al, 2006). Entre as potenciais influências genéticas, observa-se que a combinação de efeitos proliferativos nas células (mitogênicos) e danos genéticos (mutagênicos) podem ser a base do aumento de risco para o CM e alta DM (Martin & Boyd, 2008). Há clara necessidade de se melhorar o entendimento dos fatores específicos que estão envolvidos nesse processo e do papel dos fatores de crescimento tão bem quanto das intervenções hormonais nos vários componentes do tecido mamário. Em particular, é provável que a identificação dos genes, que são responsáveis pela variação na porcentagem entre os diversos tecidos da

mama (e suas funções biológicas), possa fornecer luz dentro da biologia da mama e identificar marcadores potenciais para prevenção do CM.

6.1 Fatores clínicos associados ao câncer de mama e densidade mamográfica

A idade continua sendo o principal fator de risco para o CM; as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, ocorre de forma mais lenta. O oposto acontece com a DM, que declina com a idade. Isto parece paradoxal, no entanto pode ser explicado pelo modelo de Pike et al., 1983. Este modelo é baseado no conceito de tempo durante a vida que o tecido mamário é exposto à maior densidade e atividade mitogênica. Portanto, a persistência da elevada DM ao longo da vida seria responsável pela maior incidência do CM.

Em jovens, habitualmente as mamas são densas e progressivamente sofrem involução com o decorrer da idade. Essa involução, entretanto, não é padrão em todas as mulheres e, segundo Stomper et al., 1996, 36% das mulheres de 55 a 59 anos possuem mamas densas.

Em nosso estudo, a amostra foi composta de mulheres após a menopausa, com idade entre 45 a 65 anos. Verificamos que, para cada aumento de 1 ano na idade, a probabilidade de ser classificada como mama densa, em relação à lipossustituída, diminuía 6,8%. O grupo de mulheres

com mamas densas apresentava média etária de 56,31, dp de 5,42, enquanto o grupo com mamas lipossustituídas, média de 58,16, dp 4,61. Essa relação foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) mostrando que quanto mais jovem a mulher, maior a probabilidade de ter as mamas densas (50% ou mais de tecido fibroglandular). Estes achados estão de acordo com a literatura, que apontam diminuição dos padrões de densidade mamária com o aumento da idade (Stomper et al, 1996 e Boyd et al, 2007).

Com a redução da taxa de estrogênio e progesterona, após a menopausa, o processo cíclico proliferativo celular torna-se quiescente e a imagem mamográfica torna-se, rapidamente, radiolúcida. A cada dois anos de menopausa, a DM diminui em 9% (Boyd et al., 1997). Na presente pesquisa, as mulheres mostraram ter menopausa relativamente precoce, com média de idade de 46,45 anos (dp de 6,33) para o grupo de mamas densas e 46,83 anos (dp de 6,26), para as não densas, ($p = 0,540$), não caracterizando fator de risco para alta DM. Estes dados também coincidem com os registrados por Pinho e Coutinho, 2007, em seu estudo sobre prevalência dos fatores de risco para CM na população brasileira, no qual apenas 4,4% das mulheres entrevistadas tiveram menopausa após os 55 anos de idade. Matos et al. (2010) também não encontraram, como fator de risco para CM, a idade da menopausa (média etária de 47 anos). Porém, quando associamos densidade mamográfica e o tempo decorrido após a DUM, verificamos que, para as de mamas não densas, o tempo médio foi de 11,33 anos (dp 6,42) e, para as de mamas densas, média de 9,85 (dp 7,38), diferença significativa ($p = 0,007$). Portanto, no nosso grupo, a cada dois

anos da menopausa, houve diminuição de risco de ser classificada como mama densa em 25%.

Idade da menarca está associada tanto à exposição aos hormônios ovarianos quanto a fatores nutricionais da adolescente. Mulheres com menarca antes dos 12 anos de idade possuem risco 20% maior de desenvolver CM ao longo da vida em comparação àquelas com mais de 14 anos. Menarca tardia (≥ 15 anos) diminui o risco para essa neoplasia em 28% quando comparada àquelas abaixo de 12 anos (Pike et al., 1983). Porém, outros estudos não encontraram associação entre DM e idade da menarca, sugerindo que o mecanismo pelo qual a menarca precoce aumenta o risco de câncer de mama não seja pela via da densidade mamográfica (Souza et al. 2013B; Jeon et al., 2011; Butler et al., 2008). Em nosso estudo, constatamos que este fator não influenciou a densidade mamográfica ($p=0,096$), coincidindo com prévios estudos na população brasileira (Pinho & Coutinho, 2007; Lamas & Pereira, 1999 e Ramos et al., 2009).

Durante a gravidez a termo e aleitamento, a mama alcança pleno desenvolvimento devido a uma fase inicial de crescimento seguida por uma diferenciação lobular marcada por mudança da mama tipo 1 para a tipo 3 e 4, resultando em proteção deste órgão para fatores carcinogênicos. Essas mudanças fisiológicas e endócrinas no tecido mamário são resultado de complexas interações entre hormônios e fatores de crescimento. Fatores mitogênicos, tais como os estrógenos, a prolactina e o IGF1, modificam a

composição do tecido mamário, resultando na variação da imagem mamográfica.

Aumento da DM está associado com nuliparidade e idade tardia do primeiro parto a termo. Cada nascimento reduz o risco de CM (RE⁺ e RP⁺) em 11%, e mulheres com idade tardia do nascimento do primeiro filho (≥35 anos) tiveram 27% maior risco de desenvolver CM que aquelas que tiveram o primeiro filho antes dos 20 anos de idade (Ma et al., 2006). MacMahon foi o primeiro a mostrar o efeito protetor da idade ao ter o primeiro filho a termo contra o câncer de mama, concluindo que as mães que tiveram seu primeiro parto a termo antes dos 20 anos de idade tiveram redução do risco de desenvolver CM de 50% (MacMahon et al, 1970). O efeito protetor da idade precoce ao ter o primeiro filho a termo foi igualmente observado em nossos dados, ($p<0,001$). Entre as 308 mulheres com mamas densas, a média etária, ao ter o primeiro filho, foi de 24,04 anos, sendo que 19,58%(47) tiveram o primeiro filho acima dos 28 anos de idade e 13,31%(41), com 30 anos ou mais, e 22,08% (68) eram nulíparas. Para o grupo de mulheres com mamas lipossustituídas, a média foi de 21,88 anos (dp= 5,16), e, a cada ano de retardo na idade ao ter o primeiro filho, o risco aumentou em 5,3%. Metanálise de 9 estudos cohort ou caso-controle, revelou, também, redução do risco de câncer de mama RE⁺ entre mulheres com 1º gravidez a termo antes dos 20 anos. Este efeito protetor para o CM foi observado, principalmente, em mulheres após a menopausa (Kobayashi et al, 2012).

Alterações morfológicas e funcionais do tecido mamário relacionados com a paridade têm sido extensivamente estudadas (Russo &

Russo, 2012). Com gestações sucessivas, as células epiteliais encontram-se mais diferenciadas e menos proliferativas, o que contribui para menor densidade mamográfica. Nossos dados revelaram associação estatisticamente significativa entre a paridade e a densidade mamária ($p=0,001$). O grupo de mulheres com mamas densas tinha média de paridade de 2,46, e aquelas, com mamas lipossubstituídas, média de 3,63. A cada filho a mais, o risco de ter mamas densas diminuiu em 17%, coincidindo com os dados encontrados por Lope et al em 2012, os quais detectaram que, para cada nascimento, a DM diminuía 16%. O mecanismo pelo qual esses efeitos protetores são mediados não são conhecidos, porém a maturação precoce e completa da glândula mamária tem sido sugerida como fator protetor para o CM (Toniolo et al, 2010). Portanto, com o envelhecimento da população, as baixas taxas de fertilidade e o atraso do nascimento do primeiro filho favorecem um ambiente ao aumento do risco do CM.

Quanto à etnia/cor, a mortalidade por CM varia consideravelmente entre diferentes grupos étnicos (Ghafoor et al., 2003). Nos EUA, a incidência é maior entre os caucasianos e afro-americanos; intermediária entre os hispânicos e ameríndios; e menor entre os asiáticos (American Cancer Society, 2013). No Brasil, a miscigenação da população influi na incidência da doença (Hallal et al., 2007); embora vários pesquisadores tenham encontrado maior prevalência do CM na cor branca (Sclowitz et al., 2005). No nosso grupo, a maior representação de mamas densas foi na cor branca (58,44%), seguida pela parda (21,75%), porém sem significância.

Densidade mamográfica é fator de risco forte para CM e altamente hereditário (Martin et al,2006). Mulheres com um parente de primeiro grau com diagnóstico de câncer de mama têm, em média, maior probabilidade de ter alta densidade mamográfica do que as mulheres da mesma idade sem história familiar. Além disso, a média DM aumenta com o número de parentes de primeiro grau com diagnóstico de câncer de mama (Linton et al, 2013).

No Brasil, em revisão bibliográfica realizada por Pinho e Coutinho (2007), a prevalência de história familiar de CM em parentes de primeiro grau na população feminina brasileira foi de 4%. Nossos resultados apontam que 19,2% das pacientes com mamas densas relataram ter história de CM em parentes de primeiro grau ($p=0,035$). A chance de ser classificada, portanto, com alta densidade mamográfica é 2,028 vezes maior para quem teve antecedente familiar, circunstância em que se registra uma maior prevalência desse fator de risco nessa população, sugerindo maior influência genética na DM, concordando com os dados da literatura.

As informações sobre hábito de fumar e consumo de bebidas alcoólicas foram obtidas, sendo que 14,29% de mulheres com mamas densas se declararam fumantes, e 16,23% ingeriam, pelo menos, uma dose de bebida alcoólica por dia. Alta ingestão de álcool foi associada com o aumento da DM por Vanchon et al., 2007; Herrinton et al., 1993. Matos et al., (2010), em pesquisa de prevalência de fatores de risco em mulheres com CM, observaram que 13% eram fumantes e 21,2% bebiam socialmente. No entanto, análise colaborativa de 53 estudos epidemiológicos mostraram que

o tabagismo possui pouco ou nenhum efeito no risco de desenvolvimento do CM. Meta-análise de dados de 40 estudos estimou que mulheres não alcoólatras comparadas com mulheres que consomem uma dose por dia (12g) tinham 10% no aumento de risco de CM (Ellison et al., 2001). Nossos dados não revelaram associação significativa entre densidade mamária e hábito de fumar ou consumo de bebidas alcoólicas ($p=0,161$ e $0,185$) respectivamente.

Obesidade é fator de risco conhecido para CM em mulheres após a menopausa, especialmente quando se examina a relação entre IMC em associação com a DM e CM (Lam et al., 2000). Mulheres com IMC alto apresentam menor probabilidade de terem mamas densas, no entanto, o risco para desenvolvimento de CM em mulheres com peso acima de 81 Kg quando comparadas àquelas com peso inferior a 63 Kg foi de $OR=1,7$. Convém ressaltar que, após ajustes quanto à densidade mamográfica, a OR aumentou para 2,1. Este aumento indica que densidade é um fator de risco independente e que mulher obesa com mamas densas tem acréscimo no risco de desenvolver CM. Sugere-se, ainda que, para cada 5,00 Kg de peso adquirido na vida adulta, o risco de desenvolver CM aumenta em 8% (Trentham-Dietz et al., 2000). Alta ingesta calórica, especialmente de gorduras saturadas, relaciona-se a aumento do risco para CM, e modificações na dieta, limitando o consumo de gorduras saturadas e carboidratos, podem diminuir a DM e o risco de CM (Boyd et al., 1997). Nossos dados apontam alta prevalência de obesidade, 40,4%, porém, com predominância em mulheres com mamas lipossustituídas, 47,7%. Quanto

maior a quantidade de gordura corporal, menor a densidade mamográfica. Mulheres obesas somaram 36,7% com mamas densas, diferença essa significativa, $p=0,022\%$. O mesmo ocorreu quando se fez a medida da cintura abdominal. Quanto maior a CA, maior a chance de ser classificada com mamas lipossustituídas, de tal forma que, para cada unidade de CA a mais, o risco diminui 4,7%. Dados estes que estão de acordo com a literatura (Alvares et al, 2012; Lope et al, 2012; Boyd, 2013; Souza et al, 2013C).

6.2 Densidade mamográfica e polimorfismo do gene do receptor estrogênico

Receptores estrogênicos desempenham papel crítico no desenvolvimento do tecido mamário normal e também estão envolvidos na patogênese do CM. Com efeito, cerca de dois terços dos cânceres de mama expressam o receptor estrogênico alfa. Evidências epidemiológicas, também, correlacionam hormônios esteroides às mudanças na DM, e têm analisado se variações nos genes que regulam a biossíntese e metabolismo hormonal poderiam explicar as diferenças individuais na DM. O gene do RE, localizado no braço longo do cromossomo 6q25, tem sido associado à DM em vários estudos, devido à sua importância no desenvolvimento, progressão e prognóstico do CM.

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

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

Parl et al. (1989) reconheceram que o genótipo *pp* do SNPs *PvuII* foi maior em mulheres com diagnóstico de CM em idade mais jovem. Yaich et al. (1992) examinaram o polimorfismo *PvuII* em tecido tumoral de 257 mulheres com câncer primário de mama e colheram sangue periférico de 140 controles não acometidas pela doença. Mulheres com CM e genótipo *pp* tiveram o diagnóstico de CM em idade mais precoce quando comparadas com aquelas com genótipo *PP* ou *Pp* do grupo que tiveram câncer. Investigando a frequência alélica do SNPs *PvuII* e *XbaI* em 360 casos de CM e 672 controles, Andersen et al. (1994) identificaram diferenças significantes somente para o polimorfismo *XbaI*. A frequência do alelo *x* entre as mulheres com CM foi 40% maior em comparação com os controles.

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

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

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

Nossos achados revelaram diferença estatística significativa entre os dois grupos de densidade mamográfica apenas com relação à distribuição do genótipo do polimorfismo *PvuII* ($p=0,024$). Verificou-se que mulheres com

dois alelos mutados (homozigoto mutado) apresentavam 1,75 vezes mais chances de terem mamas densas, quando comparadas àquelas com um ou dois alelos normais para esse polimorfismo (tabela 15).

Investigando a distribuição genotípica do polimorfismo *XbaI*, verificou-se que mulheres com dois alelos mutados (homozigoto mutado) apresentavam 30% maior chance (OR=1,31) de terem mamas densas, porém sem diferença significativa ($p=0,36$).

Os mecanismos moleculares pelos quais estes polimorfismos modificam a atividade do receptor não estão claros, pois *PvuII* e *XbaI* localizam-se em uma região intrônica e, aparentemente, não funcional do gene. Explicações possíveis incluem existência de combinação funcional entre os alelos polimórficos, nos quais os dois marcadores em combinação alterariam a função genética, bem como a estabilidade do RNA (Wedrén et al., 2004). Desta forma, este estudo investigou se a combinação dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* aumentava o risco de se ter mamas densas, e observou-se que estes estavam em desequilíbrio ligação ($D'=0,40$), e que o haplótipo *px*, que teoricamente é o de maior risco para o aumento de DM e CM, foi mais prevalente em mulheres com mamas densas, porém sem diferença significativa. Outra explicação seria que polimorfismos no *intron* poderiam ter uma ligação de desequilíbrio (LD) com o *éxon*, a qual afetaria a função do RE (Genari et al., 2004). A esse respeito, tem-se pesquisado se polimorfismos no *intron 1* estão em LD com polimorfismo de repetição (GT)_n localizado a 6627 pares de bases após o início do sítio de transcrição do *éxon 1* e a 144kb antes do *éxon 2*. Assim, avaliou-se, também, a interação

do polimorfismo de repetição $(GT)_n$ e o risco de ser classificada como mama densa e nenhuma interação foi observada.

Em nosso estudo as frequências alélicas e genóticas obtidas do polimorfismo $RE\alpha-397-PvuII$ ($P=46,8\%$; $p=53,2\%$) foram semelhantes às encontradas em outros estudos que correlacionaram este polimorfismo com DM ou CM (González-Mancha et al., 2008; Hu et al., 2007; Onland et al., 2005; van Duijnhoven et al., 2006; Hsieh et al., 2007, Giacomazzi, 2008) (Tabela 23).

A distribuição genotípica estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* com as seguintes frequências: genótipo pp 29,0%; Pp 48,5% e PP 22,6% (Tabela 14). As frequências alélicas para o polimorfismo $XbaI$ ($x=56,9\%$; $X=43,1\%$), foram, porém, menores quando comparadas com outros dois estudos realizados na população brasileira (Ramos et al., 2009; Giacomazzi et al., 2008), mas estiveram de acordo com a frequência encontrada por van Duijnhoven et al. (2006), por Molvarec et al. (2007) e Hsieh et al. (2007) (Tabela 24).

A distribuição genotípica para $ER\alpha-351 XbaI$ também estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* com as seguintes frequências: genótipo xx 31,6%; Xx 50,4% e XX 17,9% (Tabela 14).

Quanto ao polimorfismo de repetição SRTs $(GT)_n$, um total de 11 genótipos foi observado em nossa amostra (GT_{11} ao GT_{22}). Entre eles as repetições mais comuns foram as $(GT)_{14}$, $(GT)_{15}$, $(GT)_{16}$ e $(GT)_{17}$. Estudos prévios observaram que polimorfismos de repetição em regiões promotoras

podem ter significativa influência na regulação da transcrição. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por outro grupo de pesquisadores com maior frequência para o genótipo 16, porém sem diferenças estatísticas entre casos de CM e os controles, 41,5% e 37,6%, respectivamente. A genotipagem, contendo $(GT)_{17}$ ou $(GT)_{18}$, foi associada com diminuição do risco de CM (OR=0,58), principalmente entre as mulheres após a menopausa, com receptor de progesterona negativo e que tiveram mais que 30 anos de ciclos menstruais (Cai et al., 2003^B). Genari et al (2004) mostraram que um menor número de repetições foi associado com uma menor densidade mineral óssea e com maior risco de osteoporose. Paralelamente a estes trabalhos, nossos dados indicaram que mulheres portadoras de *STR* com sequências de repetições menores tinham mais provavelmente mama não densa, porém sem significância ($p=0,15$). Boyapati et al. (2005), pesquisando se os polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e *GT* modificariam a sobrevida de mulheres com CM, encontraram que a associação genotípica foi modificada pelo estado RE negativo ou RE positivo. Comparando aquelas com genótipo *pp* e o risco de morte foi de RR= 3,30 e 0,54 para participantes com RE- e RE+, respectivamente. Similarmente, mulheres que carregavam o polimorfismo de repetição GT_{23} foram fortemente relacionadas a tumores de mama RE- (RR= 1,48 para RE-; e RR= 0,25 para RE+).

Em relação às variáveis que evidenciaram associação com a DM (idade, CA, número de gravidez, idade ao nascimento do 1º filho, tempo decorrido após a DUM, IMC e genótipo *PvuI*), após realização de regressão logística múltipla, apenas os fatores clínicos, idade, CA, número de

gravidezes, idade ao ter o 1º filho e AF mostraram-se como fatores independentes para a mama densa ($p < 0,05$).

7. Conclusões

Em mulheres após a menopausa concluímos:

- 1) As características clínicas idade, número de gravidezes, idade ao ter o primeiro filho, história familiar de câncer de mama, tempo decorrido da última menstruação e o índice de massa corpórea revelaram associação com a densidade mamográfica.
- 2) O polimorfismo do gene do receptor estrogênico alfa *PvuII* se mostrou associado com a densidade mamográfica, no entanto, *XbaI* e *(GT)_n* não se correlacionaram de forma significativa.
- 3) Quanto à associação dos polimorfismos com as características clínicas estudadas, apenas o polimorfismo *PvuII* correlacionou-se ao número de gravidezes. No genótipo homozigoto mutado (pp), houve menor número de gravidezes.

8. Anexos

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

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

PESQUISADOR : PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT
.....

CARGO/FUNÇÃO: .PROF. TITULAR DE GINECOLOGIA-OBSTETRÍCIA DA FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ..13553.....

UNIDADE DO HCFMUSP: GINECOLOGIA OBSTETRÍCIA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒

RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : até 2013.....

- 1- Este estudo tem como objetivo verificar a frequência dos polimorfismos do gene do receptor estrogênico alfa em mulheres após a menopausa. Suas informações são voluntárias.
- 2- Serão averiguados o Peso, Altura, Circunferência abdominal e Pressão Arterial.
- 3- Serão realizados exames de rotina para a sua idade com o objetivo de afastar doenças e o câncer. **A senhora, também, irá coletar sangue para estudo genético**, com intuito de verificar possíveis risco para câncer de mama. Iremos fazer exame de mamografia. O sangue não será armazenado, e será desprezado após o termino dessa pesquisa.
- 4- O desconforto é mínimo, inerente a coleta de sangue e a mamografia .
- 5- Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo para observar a frequência de variações polimórficas do receptor estrogênico em mulheres após a menopausa. Somente no final do estudo poderemos concluir se há ou não aumento de risco.
- 6- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora executante é a Dra Marilene Alícia Souza, que pode ser encontradas Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 255- Cerqueira Cezar , ICHC-10 Andar- Sala 10173. Telefone 3069-7621.Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa , entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq)- Rua Ovídio Pires de Campos, 225- 5º andar- tel: 3069-6442 ramais 16, 17,18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26- email: cappesq@hcnet.usp.br

- 7- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento na instituição;
- 8- As informações obtidas são confidenciais e serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não será divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 9- Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa;
- 10- Não há despesas pessoais para o participante, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;
- 11- Os pesquisadores utilizarão os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;

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

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

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

APROVAÇÃO

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

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

Pesquisador (a) Responsável: **PROFA. DRA. ANGELA MAGGIO DA FONSECA**

Pesquisador (a) Executante: **MARILENE ALICIA SOUZA**

CAPPesq, 18 de Janeiro de 2011

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

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

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0297/09

Título: DENSIDADE MAMÁRIA E POLIMORFISMO DO RECEPTOR ESTROGÊNICO
EM MULHERES NA PÓS MENOPAUSA COM MAMAS DENSAS

Pesquisador Responsável: Angela Maggio da Fonseca

Pesquisador Executante: Marilene Alicia Souza

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 03/08/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 15/05/11 - Adendo e inclusão de 150 mulheres com mama não densa**

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 02 de Agosto de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0297/09

Título: DENSIDADE MAMÁRIA E POLIMORFISMO DO RECEPTOR ESTROGÊNICO EM MULHERES NA PÓS MENOPAUSA COM MAMAS DENSAS

Pesquisador Responsável: Edmund Chada Baracat

Pesquisador Executante: Marilene Alicia Souza

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 14/03/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• Carta datada de 20/02/13 - Mudança de Pesquisador Responsável de Angela Maggio da Fonseca para Edmund Chada Baracat que será o orientador da aluna Marilene Alicia Souza; Mudança de finalidade acadêmica para Doutorado; Inclusão de Pesquisador colaborador José Maria Soares Junior

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 14 de Março de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

9. Referências

1. ACR BI-RADS®. American College of Radiology. Breast Imaging Reporting and Data System. Fourth ed. Reston VA; 2003.
2. Alvares BR, Freitas CHA, Jales RM, Almeida OJ, Marussi EF. Densidade mamográfica em mulheres menopausadas assintomáticas: correlação de dados clínicos e exames ultrassonográficos. *Rev Radiologia*. 2012;45(3):149-54.
3. American Cancer Society - ACS. [cited 2013 jul. 6]. Available from: <http://www.cancer.org/>.
4. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Borresen AL. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet*. 1994;94:665-70.
5. Baracat EC & Kemp C. Fisiologia mamária. In: Pasqualetto HA, Koch HA, Soares-Pereira PM. *Mamografia Atual*. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p.31-8.
6. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991;64(2):235-48.
7. Blane CE, Fitzgerald JT, Gruppen LD, Helvie MA, Andersson I. Decreasing rate of fatty involution at screening mammography. *Acad Radiol*. 2002;9:895-8.
8. Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Smith JR, Wen W, Gao YT and Zheng W. Polymorphisms in ER α gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1093-8.
9. Boyd NF. Mamographic density and risk of breast cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013;2013:57-62.

10. Boyd NF, Guo H, Martin IJ, Sun L, Stone J, Fishell E. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(3):227-36.
11. Boyd NF, Martin LJ, Bronskill M, Yaffe MJ, Duric N, Minkin S. Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:1224-37.
12. Boyd NF, Greenberg C, Lockwood G, Little L, Martin L, Byng J, Yaffe M, Tritchler D. Effects at two years of a low-fat, high-carbohydrate diet on radiologic features of the breast: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(7):488-96.
13. Boyd NF. Tamoxifen, mammographic density, and breast cancer prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:704-5.
14. Brandi ML, Becherini L, Gennari L, Racchi M, Bianchetti A, Nacmias B, Sorbi S, Mecocci P, Senin U, Govoni S. Association of the estrogen receptor α gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochemical Biophysical Res Communications*. 1999; 265(2): 335-8.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. [citado 23 mar. 2013]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>
16. Buttler LM, Gold EB, Greendale GA, Crandall CJ, Modugno F, Oestreicher N, Quesenberry Jr CP, Habel LA. Menstrual and reproductive factors in relation to mammographic density: the study of women's health across the nation (SWAN). *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(1):165-74.

17. Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Brinton LA. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age and menopause status. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1622-9.
18. Cai Q, Gao YT, Wen W, Shu XO, Jin F, Smith JR and Zheng W. Association of breast cancer risk with a GT dinucleotide repeat polymorphism upstream of the estrogen receptor- α gene. *Cancer Res.* 2003A;63:5727-30.
19. Cai Q, Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Cheng JR, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor α gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003B;12(9):853-9.
20. Clendenen T, Zeleniuch-Jacquotte A, Wirgin I, Koenig KL, Afanasyeva Y, Lundin E, Arslan AA, Axelsson T, Försti A, Hallmans G, Hemminki K, Lerner P, Roy N, Chen Y. Genetic Variants in Hormone-Related Genes and Risk of Breast Cancer. *PLOS ONE.* 2013;8:367-72. doi:10.1371/journal.pone.0069367.
21. Crandall CJ, Sehl ME, Crawford SL, Gold EB, Habel LA, Butler LM, Sowers MR, Gendale GA, Sinsheimer JS. Sex steroid metabolism polymorphisms and mammographic density in pre – and early perimenopausal women. *Breast Cancer Res.* 2009;11:1-15.
22. Cumming SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, Vogel V, Shepherd J, Vachon C, Smith-Bindman R, Kerlikowske K. Prevention of breast cancer in postmenopausal women: approaches to estimating and reducing risk. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:384-98.
23. Curran JE, Lea RA, Rutherford S, Weinstein SR, Griffiths LR. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene

- polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer*. 2001;95:271-5.
- 24.** Cuzick J, Warwick J, Pinney E, Duffy SW, Cawthorn S, Howell A, Forbes JF and Warren RML. Tamoxifen-induced reduction in mammographic density and breast cancer risk reduction: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(9):744-752.
- 25.** Del Senno L, Aguiari GL, Piva R. Dinucleotide repeat polymorphism in the human estrogen receptor (ESR) gene. *Hum Mol Genet*. 1992;1(5):354.
- 26.** Ding SL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Hsu HM, Ho JY, Lin YH, Chang CC, Fann CSJ, Cheng CW, Wu PE, Shen CY. Diverse associations between ESR1 polymorphism and breast cancer development and progression. *Clin Cancer Res*. 2010;16:3473-84
- 27.** Dumas I, Diorio C. Polymorphisms in genes involved in the estrogen pathway and mammographic density. *BMC Cancer*. 2010;10:636-45.
- 28.** Dumas I, Diorio C. Estrogen pathway polymorphisms and mammographic density. *Anticancer Res*. 2011;31:4369-86.
- 29.** Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, Teare MD, Ponder BAJ and Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 1999;8:843-54.
- 30.** Dunning AM, Healey CS, Baynes C, Maia AT, Scollen S, Vega A, Rodrigues R, Barbosa-Morais NL. Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Hum Mol Genet*. 2009;18:1131-9.

-
31. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PDP, Thompson D, Ballinger DG, Jeffery P. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nat Med*. 2007;447:1087-93.
32. Ellisson RC, Zhang Y, McLennan CE, Rothman KJ. Exploring the relation of alcohol consumption to risk of breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2001;154(8):740-7.
33. Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol Palo Alto*. 2003;54:357-74.
34. Garcia-Closas M, Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor (ER) status. *Clin Cancer Res*. 2008;14:8000-9.
35. Gennari L, Merlotti D, Paola VD, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004;161(4):307-20.
36. Giacomazzi J. *Fatores de risco para o câncer de mama e polimorfismos nos genes ER, PR e STK15 em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre*. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.
37. Ghafoor A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Thun M. Trends in breast cancer by race and ethnicity. *CA Cancer J Clin*. 2003;53(6):342-55.
38. GLOBOCAN, 2008. International Agency for Research on Cancer (IARC). Disponível em: <http://www-dep.iarc.fr/globocan.iarc.fr/> (acessado em 03/08/2013).

- 39.** González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, Pérez LI, González-Perez A, Morón FJ, Nogueira JAM, Real LM, Pascual MH, Ruiz A, Royo JL. Analysis of the ER alpha germline *PvuII* marker in breast cancer risk. *Med Sci Monit.* 2008;14:136-43.
- 40.** Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Harty Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986;231:1150-4.
- 41.** Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of nuclear receptor superfamily. *Nature.* 2004;3:950-64.
- 42.** Hallal PC, Dumith SC, Bastos JP, Reichert FF, Siqueira FV, Azevedo MR. Evolução da pesquisa epidemiológica em atividade física no Brasil: revisão sistemática. *Rev Saúde Pública.* 2007;41(3):453-60.
- 43.** Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta isoform (ER beta) of the human estrogen receptor modulates ER alpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 1999;140:5566-78.
- 44.** Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17(5):1474-81.
- 45.** Harvey JA, Bovbjerg VE. Quantitative assessment of mammographic breast density: Relationship with breast cancer risk. *Radiology.* 2004;230:29-41.

-
46. Herrinton LJ, Saftlas AF, Stanford JL, Brinton LA, Wolfe JN. Do alcohol intake and mammographic densities interact in regard to the risk of breast cancer? *Cancer*. 1993;71:3029-35.
47. Hill WG, Robertson A. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet*. 1968;38:226-31.
48. Hollenbeck S, Keely P, Seewaldt V. Mammographic density. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013;2013:63-9.
49. Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, Robbins J, Lee RT. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med*. 2007;13:970-4.
50. Hu Z, Song CG, Lu JS, Luo JM, Shen ZZ, Huang W, Shao ZM. A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007;133(12):969-78.
51. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [sitio na internet]. Diretoria e pesquisa. Departamento de População e Indicadores Sociais. [citado 2 fev. 2012]. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/> 2013.
52. Instituto Nacional do Câncer - INCA. [citado 2 fev. 2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
53. Jakimiuk AJ, Nowicka M, Bogusiewicz M, Adamiak A, Skorupski P, Miotla P, Rechberger T, Haczynski J. Prevalence of estrogen

receptor alpha *PvuII* and *XbaI* polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochemica Cytobiologica*. 2007;45(4):331-8.

- 54.** Javed S, Ali M, Sadia S, Aslam MA, Masood AI, Shaikh RS, Sayyed AH. Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. *Maturitas*. 2011;69(4):377-82.
- 55.** Jeon JH, Kang JH, Kim Y, Lee HY, Choi KS, Jun JK, Oh DK, Lee CY, Ko K, Park EC. Reproductive and hormonal factors associated with fatty on dense breast patterns among Korean women. *Pubmed Cancer Res Treat*. 2011;43(1):42-48.
- 56.** Kato I, Beinart C, Bleich A, Su S, Kim M, Toniolo PG. A nested case-control study of mammographic patterns, breast volume, and breast cancer (New York City, United States). *Cancer Causes Control*. 1995;6:431-8.
- 57.** Keaveney M, Klug J, Dawson MT, Nestor PV, Neilan JG, Ford RC, Gannon F. Evidence for a previously unidentified upstream exon in the human oestrogen receptor gene. *J Mol Endocrinol*. 1991;6:111-5.
- 58.** Key TJ. Endogenous oestrogens and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women. *Steroids*. 2011;76: 812–15
- 59.** Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Kado N, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Honjo H. Oestrogen

receptor α gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod.* 2001;16:51-5.

60. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 2000; 65:227-51.
61. Kobayashi S, Sugiura H, Ando Y, Shiraki N, Yanagi T, Yamashita H and Toyama T. Reproductive history and breast cancer risk. *Breast Cancer.* 2012; 19:302-8
62. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Genomic organization of the human ER α gene promoter region. *Mol Endocrinol.* 2001;15(12):2057–63.
63. Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, Singh R, Bhasin S, Jasuja R. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids.* 2011;11:1-7.
64. Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today.* 1999;5(12):538-43.
65. Ladd AMGZ, Vásquez AA, Rivadeneira F, Siemes C, Hofman A, Stricker H Ch, Pols HAP, Uitterlinden AG, van Duijn CM. Estrogen receptor α polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;107:415-9.
66. Lam PB, Vacek PM, Geller BM, Muss HB. The association of increased weight, body mass index, and tissue density with risk of breast carcinoma in Vermont. *Cancer.* 2000;89:369-75.

- 67.** Lamas JM, Pereira MG. Fatores de risco para o câncer de mama e para lesões pré-malignas em mulheres assintomáticas no Distrito Federal. *Rev Bras Mastol*. 1999; 9:108-14.
- 68.** Li J, Humphreys K, Eriksson L, Edgren G, Czene K, Hall P. Mammographic density reduction is a prognostic marker of response to adjuvant tamoxifen therapy in postmenopausal patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:2249-56.
- 69.** Linton L, Martin LJ, Li Q, Huszti E, Minkin S, John EM, Rommens J, Paterson AD and Boyd NF. Mammographic density and breast cancer: a comparison of related and unrelated controls in the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res*. 2013; 15: 43-50.
- 70.** Lope V, Perez-Gomes B, Sánchez-Contador C, Santamariña MC, Moreo P, Vidal C, Laso MS, Ederra M, Pedraz-Pingarrón C, González-Román I, García-López M, Salas-Trejo D, Peris M, Moreno MP, Vázquez JÁ, Collado F, Arogonês N, Pollán M. Obstetric history and mammographic density: a populacional-based cross-sectional study in Spain (DDM-Spain). *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132:1137-46.
- 71.** Macchetti AH; Marana HRC. Densidade mamográfica como fator de risco para o câncer de mama. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2007;29 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032007001000001>
- 72.** MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG and Yuasa S. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ*. 1970; 43: 209–21.

73. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res.* 2006;8:43-54.
74. Martin LJ & Boyd NF. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res.* 2008;10:1-14.
75. Martin KE, Helvie MA, Zhou C, Roubidoux MA, Bailey JE, Paramagul C, et al. Mammographic density measured with quantitative computer-aided method: comparison with radiologists' estimates and BI-RADS categories. *Radiology.* 2006;240:656-65.
76. Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, Ohnuma T, Arai H, Yasuda M, Tanaka C, Emson PC, Nakamura S, Kawakami H. Lack of association of estrogen receptor α gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 2000;57(2):236-40.
77. Maskarinec G, Pagano I, Lurie G, Kolonel LN. A longitudinal investigation of mammographic density: the multiethnic cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:732-9.
78. Massart F, Becherini L, Gennari L, Facchini V, Genazzani AR, Brandi ML. Genotype distribution of estrogen receptor α gene polymorphisms in Italian women with surgical uterine leiomyomas. *Fertil Steril.* 2001;75:567-70.

-
- 79.** Matos JC, Pelloso SM, Carvalho MDB. Prevalência de fatores de risco para o câncer de mama no município de Maringá, Paraná. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 2010;18(3):57-64.
- 80.** McCormack VA & Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of a breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1159-69.
- 81.** Miyano M, Kawashima T, Ohyama T. A common feature shared by bent DNA structures locating in the eukaryotic promoter region. *Mol Biol Rep*. 2001;28(1):53-61.
- 82.** Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M. Estrogen receptor alpha (ESR1) *pvuII* and *XbaI* gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clin Chim Acta*. 2007;382:100-5.
- 83.** Nicholson BT, LoRusso AP, Smolkin M, Bovbjerg VE, Petroni GR, Harvey JA. Accuracy of Assigned BI-RADS breast density category definitions. *Acad Radiol*. 2006;13:1143-9.
- 84.** Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Variação genética em indivíduos e populações: mutação e polimorfismo. In: Thompson & Thompson editors. *Genética Médica*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p.181-214.
- 85.** Onland- Moret NC, van Gils CH, Roest M, Grobbee DE & Peeters PHM. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2005;16:1195-202.
- 86.** Osborne CK & Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2005;23(8):1616-22.

-
87. Parl FF, Cavener DR, Dupont WD. Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1989;14:57-64.
88. Pharoah PDP, Antoniou AC, Easton DF and Ponder BAJ. Polygenes, risk prediction and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:2796-802.
89. Pharoah PDP, Dunning AM, Ponder BAJ, Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:850-60.
90. Pichard C, Plu-Bureau G, Neves-e Castro M, Gompel A. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas Eur Menopause J.* 2008;60:19-30.
91. Pinho VFS & Coutinho ESF. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. *Cad Saúde Pública.* 2007;23(5):1061-9.
92. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG. 'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature.* 1983;303:767-70.
93. Quetelet A. *Physique sociale: ou , essai sur le développement des facultés de l'homme* . Brussels, Belgium: C. Muquardt; 1869.
94. Ramos EHM, Martinelli S, Silva I, Nazário A, Facina G, Costa A, Carvalho C, Souza N. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric.* 2009;1(12):490-501.

-
- 95.** Ramos EHM, Kemp C, Silva IDCG. Associação entre os polimorfismos HaeIII e MspI do gene para o receptor alfa de estrogênio e densidade mamográfica em mulheres após a menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006;10(28):581-9.
- 96.** Russo & Russo. Molecular basis of pregnancy-induced breast cancer prevention. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2012;9:3–10.
- 97.** Saftlas AF, Hoover RN, Brinton, LA. Mammographic density and breast cancer risk. *Câncer.* 1991;67:2833-38.
- 98.** Sand P, Luckhaus C, Schlurmann K, Gotz M, Deckert J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J Neural Transm.* 2002;109:567-83.
- 99.** Schatz T, Langowski J. Curvature and sequence analysis of eukaryotic promoters. *J Biomol Struct Dyn.* 1997;15(2):265-75.
- 100.** Schor N, Boim MA, Santos OFP, Silva IDCG, Baracat EC. *Bases moleculares da ginecologia.* São Paulo: Atheneu; 2004. v.2, p.83-4.
- 101.** Schuit SC, Oei HH, Witteman JC, Geurts VKCH, van Meurs JB, Nijhuis RL, van Leeuwen JP, de Jong FH, Zillikens MC, Hofman A, Pois HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA.* 2004;29(24):2969-77.
- 102.** Sclowitz ML, Menezes AMB, Gigante DP, Tessaro S. Condutas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. *Rev Saúde Pública.* 2005; 39(3):340-9.

- 103.** Shen Y, Li DK, Wu J, Zhang Z, gao E. Joint effects of the CYP1A1 MspI, ER α Pvull and ER α XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer : results from a population-based case-control study in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15:342-7.
- 104.** Shin A, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park SK, Kim SU, Noh DY, Choe KJ, Ahn SH, Hirvonen A, Kim JH, Yoo KY. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;80:127-31.
- 105.** Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Hortense VHS, Franzolin SOB, Soares-Jr JM, Baracat EC. Polymorfisms in the estrogen receptor alpha gene and mammographic density result study in Brazilian women. *J Cancer Sci Ther.* 2013A;5:446-451.
- 106.** Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Franzolin SOB, Carvalho KC, Soares-Jr JM, Baracat EC. Polymorfisms of estrogen receptor- α gene in Brazilian women with high breast density after menopause. *Gynecol Endocrinol.* 2013B;29:771-4.
- 107.** Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Neves EM, Moraes SD, Hortense VH, Soares JM, Baracat EC. The expression of the estrogen receptor in obese patients with high breast density (HBD). *Gynecol Endocrinol.* 2013C; 30:78-80.
- 108.** Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Soares-Jr JM, Barros N, Franzolin SOB, Baracat EC. Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco do câncer de mama. *Femina.* 2012;40:179-186.

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

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

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

112. Toniolo P, Grankvist K, Wulff M, Chen T, Johansson R, Schock H, et al. Human chorionic gonadotropin in pregnancy and maternal risk of breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70:6779–86.

113. Torres-Mejia G, De Stavola B, Allen DS. Mammographic features and subsequent risk of breast cancer: A comparison of qualitative and quantitative evaluations in the Guernsey prospective studies. *Câncer Epidemiol Biomarkers Anterior* . 2.005; 14:1052-9.

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

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

- 116.** Vacek PM, Geller BM. A prospective study of breast cancer risk using routine mammographic breast density measurements. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004;13:715-22.
- 117.** Vachon CM, Sellers TA, Carlson EE, Cunningham JM, Hilker CA, Smalley RL, Chaid DJ, Kelemen LE, Couch FJ, Pankratz VS. Strong evidence of a genetic determinant for mammographic density, a major risk factor for breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67:8412-8.
- 118.** Van Duijnhoven FJB, Peeters PHM, Warren RML, Bingham SA, Uitterlinden AG, van Noord PAH, Monninkhof EM, Grobbee DE, van Gils CH. Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15(3):462-7.
- 119.** Van Gils CH, Hendriks JH, Otten JD, Holland R, Verbeek AL. Parity and mammographic density in relation to breast cancer risk: indication of interaction. *Eur J Cancer Prev.* 2000; 9:105-11.
- 120.** Von Drygalski A, Tran TB, Messer K, Pu M, Corringham S, Nelson C, Ball ED. Obesity is an independent predictor of poor survival in metastatic breast cancer: retrospective analysis of a patient cohort whose treatment included high-dose chemotherapy and autologous stem cell support. *Int J Breast Cancer.* 2011;2011:1-8.
- 121.** Waard F, Baanders-Van HEA. A prospective study in general practice on breast-cancer risk in postmenopausal women. *Int J Cancer.* 1974;14(2):153-60.

- 122.** Wang J, Higuchi R, Modugno F, Jia L, Umblas N, Lee J, Lui LY, Ziv E, Tice JÁ, Cummings SR, Rhee B. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;10:273-80.
- 123.** Wedren S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvanen AC, Kindmark A, Landfren U, Fermer ML, Stiger F, Persson I, Baron J, Weiderpass E. Oestrogen receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res.* 2004;6(4):437-49.
- 124.** Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedren S, Kindmark A, Baron JA. Estrogen receptor α gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis.* 2000; 21:623-7.
- 125.** Weigel RJ, Crooks DL, Iglehart JD, deConinck EC. Quantitative analysis of the transcriptional start sites of estrogen receptor in breast carcinoma. *Cell Growth Differentiation.* 1995;6:707-11.
- 126.** WHO, 2013. [cited 2013 mar. 13]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013>.
- 127.** Wild C. Polymorphisms-screening: genetic testing for predisposition- guidance for technology assessment. *Poiesis & Praxis: Inter J Ethics Science Technology Assessment.* 2008;5:1-14.
- 128.** Wolfe JN. Breast patterns as an index of risk for developing breast cancer. *Am J Roentgenol.* 1976;126:1130-9.

- 129.**Wray NR, Visscher PM. Population genetics and its relevance to gene mapping. In: Neale BNM, Ferreira MAR, Medland SE, Posthuma D, editors. Statistical genetics: gene mapping through linkage and association. New York: Taylor & Francis Group; 2008. p.87-112.
- 130.**Wu PE, Shen CY. 'Hide-then-hit' to explain the importance of genotypic polymorphism of DNA repair genes in determining susceptibility to cancer. J Mol Cell Biol. 2011;3:59-65.
- 131.**Yaich L, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF. Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. Cancer Res. 1992;52:77-83.
- 132.**Zuppan P, Hall JM, Lee MK, Ponglikitmongkol M and King MC. Possible linkage of the estrogen receptor gene to breast cancer in a family with late-onset disease. Am J Hum Genet. 1991;48:1065-8.

Apêndices

ARTIGOS PUBLICADOS

1-Polymorfisms in the estrogen receptor alpha gene and mammographic density result study in Brazilian women.

Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Hortense VHS, Franzolin SOB, Soares-Jr JM, Baracat EC. *J Cancer Sci Ther.* 2013;5:446-51

2-Polymorfisms of estrogen receptor- α gene in Brazilian women with high breast density after menopause.

Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Franzoli SOB, Carvalho KC, Soares-Jr JM, Baracat EC. *Gynecological Endocrinology.* 2013; 29:771-4.

3-The expression of the estrogen receptor in obese patients with high breast density (HBD).

Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Neves EM, Moraes SD, Hortense VH, Soares JM, Baracat EC. *Gynecol Endocrinol.* 2013; 30:78-80.

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

Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Soares-Jr JM, Barros N, Franzolin SOB, Baracat EC. *Femina.* 2012; 40:179-86.

5-Impact of age and body mass on the intensity of menopausal symptoms in 5968 Brazilian women

Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, **Marilene Alícia Souza**, Raymundo Soares Azevedo, Euro de Barros Couto Júnior, José Maria Soares Júnior & Edmund Vhada Baracat.
Gynecological Endocrinology. 2013;29:116-118.

6-Tratamento hormonal do hirsutismo baseado em evidência.

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

Femina 2010; 38: 402-413.

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

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

RAMB 2009;55: 236-7.

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

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

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

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

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

Gynecological Endocrinology, 2012.

10-Tratamento da mulher climatérica.

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

Revista Brasileira de Medicina

RBM – Edição Especial Climatério 2012; 69: 2-7. ISNS 0034-7264

11-Clinical factors associated with high mammographic density in postmenopausal women and their relationship with dinucleotide GTn repeat polymorphism in the estrogen receptor alpha gene.

Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Hortense VHS, Carvalho KC, Soares-Jr JM, Baracat EC.

Journal Cancer Science Therapy.

ARTIGOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO

1-The Association of dinucleotide GT repeat polymorphism of estrogen receptor alpha gene with risk factors for breast cancer in women with high mammographic density.

Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Hortense VHS, Soares-Jr JM, Baracat EC.

Journal Steroids

COLABORADORA EM LIVROS

Dados Demográficos, Epidemiológicos e Clínicos de Mulheres Brasileiras Climatéricas.

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

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

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

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

Amenorréia Secundária – Caso 31. In: Baracat EC, Melo NR, Salomão AJ, Soares Jr JM (Eds). Ginecologia Baseada em Casos Clínicos. Cezarino PYA, Bagnoli VR, Souza MA, Soares Jr JM, Fonseca AM.

Editores Manole Ltda 2013. Cap 31. p.271-276.ISBN 978-85-204-2589-3.

Hermafroditismo Verdadeiro – Caso 37. In: Baracat EC, Melo NR, Salomão AJ, Soares Jr JM (Eds). **Ginecologia Baseada em Casos Clínicos.**

Fonseca AM, Silva JSP, Souza MA, Bagnoli VR.

São Paulo, Editora Manole Ltda 2013. Cap 37. p.319-324. ISBN 978-85-204-2589-3

Síndrome de Sheehan – Caso 46. In: Baracat EC, Melo NR, Salomão AJ, Soares Jr JM (Eds). **Ginecologia Baseada em Casos Clínicos.**

Souza MA, Fonseca AM, Cavalcanti AL, Bagnoli VR.

Editora Manole Ltda 2013. Cap 46. p.415-422. ISBN 978-85-204-2589-3.

CAPÍTULOS DE LIVRO EM PUBLICAÇÃO

Amenorréia primária – diagnóstico e tratamento

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

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

Editor: Edmund Chada Baracat

Distúrbios do sono no climatério

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

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

Editor: Edmund Chada Baracat

Amenorréia Secundária

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

Livro: Casos Clínicos - Ginecologia Endócrina.

Editor: Edmund Chada Baracat

Hermafroditismo Verdadeiro

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

Livro: Casos Clínicos - Ginecologia Endócrina.

Editor: Edmund Chada Baracat

Amenorréia

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

Livro: Diagnóstico e Tratamento em Clínica Médica.

Editor: Antonio Carlos Lopes

Assistência à mulher no climatério e na sensibilidade.

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

Livro: Tratado de Clínica Médica

Editor: Antônio Carlos Lopes

Amenorréia secundária

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

Livro: Terapêutica clínica em ginecologia FMUSP

Prevenção e tratamento da osteopenia e osteoporose

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

Livro: Terapêutica clínica em ginecologia FMUSP

Disfunção sexual e climatério

Ana Lúcia Cavalcante, Jucilene Sales da Paixão Silva, **Marilene Alicia de Souza**.

Livro: Terapêutica clínica em ginecologia FMUSP

APRESENTAÇÃO DE POSTERS

Polymorfisms of estrogen receptor- α gene in Brazilian women with high breast density after menopause.

Marilene Alícia Souza, Angela Maggio da Fonseca, Vicente Renato Bagnoli, Nestor Barros, Solange O Braga Franzolin, Katia Carvalho, José Maria Soares-Jr, Edmund Chada Baracat.

Apresentação no RCOG WORLD CONGRESS 2013 LIVERPOOL UK, em Liverpool – Inglaterra. 24 – 26 de junho 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Síndrome de Sheehan com preservação das gonodotrofinas.

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

Marilene Alicia Souza.

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

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

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

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

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

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

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

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

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

Research Article

Open Access

Polymorphisms in the Estrogen Receptor Alpha Gene and Mammographic Density Result Study in Brazilian Women

Marilene Alicia Souza^{1*}, Angela Maggio da Fonseca¹, Vicente Renato Bagnoli¹, Nestor de Barros¹, Victor Hugo Souza Hortense², Solange Oliveira Braga Franzolin³, José Maria Soares Jr¹ and Edmund Chada Baracat¹

¹Department of Obstetrics Gynecology, Faculty of Medicine, University of São Paulo (HC-FMUSP), Brazil

²Department of Radiology/Mammography, Faculty of Medicine, University of São Paulo (HC-FMUSP), Brazil

³Faculty of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná (FM-PUC), Brazil

⁴Faculty of Medicine, State University of São Paulo (UNESP), Brazil

Abstract

The estrogen receptor (ER) is a ligand-activated transcription factor that mediates the actions of the estrogen in target tissues. Several ER α gene polymorphisms are associated with changes in the receptor expression and function. The aim of this study is to verify the hypothesis that the ER α gene polymorphisms could be associated with high mammographic density (HMD), a well known independent risk factor for breast cancer (BC) in a case-control study carried out in the city of São Paulo (SP, Brazil) from 2010 to 2013. Two ER α gene polymorphisms named *PvuII* and *XbaI* was examined in 308 cases and 155 controls. The *PvuII* polymorphism was associated with an increased risk of having high mammographic density (HMD) post menopause, after adjustment for other risk factors, the odds ratio for pp genotypes was 1.75 (confidence interval of 95% CI 95%=1.10-2.79) compared with the genotypes PP and Pp. The *XbaI* polymorphism was also associated with a high risk of HMD, but not statistically significant, odds ratio for xx genotype was 1.31 (95% CI=0.7 to 1.9). No apparent synergistic effects of these two polymorphisms were identified. It was concluded that the *PvuII* polymorphism in the gene ER α was associated with an increasing chance of have HMD, a strong risk factor for BC. Thus recognizing these risk factors will be of great importance in the analyses of individual susceptibility to BC, in both the study of the response to various drugs and the prognosis.

Keywords: Breast neoplasms; Estrogen receptors; Genetic polymorphism; Mammography; Risk factors

Introduction

Estrogens affect the growth, differentiation and function of many target tissues including breast, uterus, vagina, ovary, testicles, epididymis, and prostate [1]. The biological effect of the estrogens such as growth and differentiation of normal breast tissue is mediated primarily through high affinity binding to its ER. The ERs are intranuclear proteins that possess a binding domain to the estrogen and a binding domain with the DNA [2]. There are two types of ERs (α and β). The ER α gene is located [3] on chromosome 6q25.1, and the ER β gene is located on chromosome 14q22-24. Among the steroid receptors the ER α and the progesterone receptors (PR) are of special interest because their protein levels are elevated in malignant breast cells [4-6]. Both ER and PR prove to be significant prognostic factors for BC [7]. Therefore the inhibition of ER has become a major strategy for the prevention and treatment of BC [8].

The combination of ER α gene polymorphisms and the risk of diseases, including BC have become subject of growing interest. Thus, several studies have indicated that variations in the DNA sequence of the ER α gene increase the risk of developing BC and HMD after menopause. Some studies are summarized in Tables 1 and 2.

The studies of polymorphisms related to diseases are tools that may have direct implication of great importance in the analysis of individual susceptibility to BC in the study of response to various drugs and prognosis. The ultimate goal of these strategies is to reduce the anxiety of the patients and greatly improve the approach and management of a woman with or without risk, facilitating the implementation, planning and the adoption of preventive strategies.

This article presents the results of the case-control study in the city

of São Paulo, that examined the association of the polymorphisms in the genes *ER α -PvuII* and *ER α -XbaI* with the risk of high mammographic density after menopause. The associations of these polymorphisms with other risk factors for breast cancer were also evaluated.

Methods

Case-control study that included 308 women with HMD (for more than 50% density) and 155 controls (to 50% density or less) evaluated by computerized objective method [25], aged 45-65, without menstruation or hormone therapy for at least 1 year, without previous BC and ovarian cancer. Initially, the patients were selected in a subjective way by the standard ACR-BIRADS[®], by a unique reader (the head) from the Institute of Radiology, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), São Paulo, Brazil, from January 2010 to March 2013. The selected patients were evaluated again, now objectively, by another reader as described by Boyd et al. 2013 [25]. The study was approved by the Ethics Committee for Analysis of Research Projects - CAPESq HC-FMUSP, and all women signed informed consent. It was characterized in the clinical

***Corresponding author:** Marilene A Souza, Rua Azarias Leite, 12-22, Bauru, SP, CEP 17010250, Brazil, Tel: 551432236538; Fax: 551432236538; E-mail: marilenealicia@hotmail.com

Received November 24, 2013; **Accepted** December 23, 2013; **Published** December 31, 2013

Citation: Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, de Barros N, Hortense VHS, et al. (2013) Polymorphisms in the Estrogen Receptor Alpha Gene and Mammographic Density Result Study in Brazilian Women. J Cancer Sci Ther 5: 446-451. doi:10.4172/1948-5956.1000239

Copyright: © 2013 Souza MA, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Genotype	Allele	Country	Type and size of the study	Association	OR/RR	References
ERα-397 T/C PvuII	TT	USA pre-andpostmenopausal	Only Cases/Case Control 257/140	Diagnosis in younger women		Yaich et al. [9]
	TT	Shanghai, China	Case/control 1069/1166	↑ risk for breast cancer	OR: 1.4 IC 95%: 1.1-1.8 p=0.042	Cai et al. [10]
	TT	Netherlands	Case/control 380/422	↑ risk for breast cancer	RR: 1.5 IC 95%: 0.94-2.42	Onland-Moret et al. [11]
	TT	China 25 a 55 years-old	Case/control 259/278	↑ risk of breast cancer in women with a positive family history	OR: 3.04 IC 95%: 0.73-12.67	Shen et al. [12]
	TT	Spain 26 to 86 years-old	Case/control 444/704	↑ risk of breast cancer in women with a positive family history	OR: 3.81 IC 95%: 1.25-11.6	Gonzalez-Mancha et al. [13]
	TT	Netherlands 55 years or more	Case/control 190/3513	↑ risk of breast cancer in women after menopause	OR: 1.4 IC 95%: 0.8-2.2	Ladd et al. 2007 [14]
	TT	USA peri-menopause 42 to 52 years-old	longitudinal cohort 451	↑ Increased mammographic density in white women	7.0%; p=0.01	Crandall et al. [15]
	TT	Brazil After-menopause	Only cases 308 women	Mammographic density>50%	TT=32.14% greater than CC=20.13%	Souza et al. [16]
	TT/TC	Netherlands and England After-menopause	Population Cohort prospective case/control (795 with HT/781 with no HT)	↑ Increased mammographic density only in HT users	2.24% p<0.01	van Duijnhoven et al. [17]
	TC	Netherlands	Caso/control 380/422	↑ risk for BC	OR: 1.14 IC 95%: 1.00-1.32	Onland-Moret et al. [11]
	TC	China 25-55 anos	Case/control 259/278	↑ risk for BC(with family history)	OR: 2.46 IC 95%: 0.61-9.88	Shen et al. [12]
	CC	Shanghai, China 22-64 years-old	Prospective Population Cohort 1459 cases	RE negative expression; worse prognosis for breast cancer	OR: 3.30 IC 95%: 1.42-7.69	Boyapatti et al. [5]
	CC	Netherlands and England After-menopause	Population Cohort prospective case/control [795/781]	Mammographic density without changes in user HT	0.90% p=0.47	van Duijnhoven et al. [17]

Table 1: Association studies of the ERα-397 gene polymorphism *PvuII* C/T with BC and/or risk factors for disease.

history and physical examination: age at menarche and menopause, parity, age at first birth, family history of breast cancer (FHBC), smoking, alcohol intake and body mass index (BMI). Peripheral blood samples were obtained for genomic DNA extraction and determination of polymorphisms in question.

The genomic DNA was extracted from peripheral blood using QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen*), following manufacturer instructions. After DNA quality and integrity evaluation were performed PCR-RFLP assay for Estrogen Receptor *PvuII* and *XbaI* polymorphism analysis as described by Herrington et al. 2002 [26]. The laboratory was blinded on the subject identification.

Hardy-Weinberg Equilibrium (H_W) was used to verify if the genotype frequencies of *PvuII* and *XbaI* polymorphisms in our population were in genetic equilibrium. Simple mathematical model [(p+q)²=p²+2pq+q²] used to calculate genotype frequencies from allele frequencies.

Statistical analysis: The data were described using average, standard deviation (sd), absolute frequency (n) and relative frequency (%). To verify the association between qualitative variables with the mammographic density was used the chi-square (X²). For comparison between the groups of HMD and controls as quantitative variables was used the *Kolmogorov-Smirnov Test* to verify the normality of the data, as these are not normally distributed in all groups, was used the nonparametric *Mann-Whitney Test* for comparison between groups. To verify the relationship of the variables with the occurrence of high mammographic density was used Multivariate Logistic Regression model stepwise backward. The variables that entered in the model were those presented in the bivariate analyzes values p<0.20. In all statistical tests were adopted a significance level of 5% (p<0.05).

Results

The distributions of selected demographic characteristics that are the main risk factors for breast cancer are presented in Table 3. It was observed elevated risk of HMD for the main risk factors that have been reported in other previous studies [20,16].

The risk of having HMD was also elevated for younger women, lower WC, fewer pregnancies, higher age at having first birth, high number of women with a FHBC. It was not observed any apparent modification effect for other indicators of exposure to endogenous estrogens and lifestyle factors. In our study, the sample consisted of postmenopausal women, aged 45-65 years.

The allele frequencies of *ERα-PvuII* and *ERα-XbaI* in both groups were similar to those reported in previous studies [16,17,20,27-29].

Regarding the genotype, 21.5% of controls and 32.5% of cases were mutated homozygous (pp), and 28.5% of controls and 19.8% of cases were wild homozygous (PP), with statistically significant difference (X²=7.42, p=0.024). OR adjusted for pp genotype was 1.75 (95% CI=1.10 to 2.79) compared with PP and Pp genotype. There were not any significant difference in allele frequency or genotype polymorphism *ERα-XbaI* between controls and cases (Table 4).

When the two ERα polymorphisms were analyzed together, no synergistic effect was consistently noted.

Additional analyzes (Multivariate Logistic Regression) were performed to evaluate the independent risk factors for HMD. From all clinical characteristics analyzed, entered only those presented in the bivariate analyzes values p<0.20 were included in the model: the *PvuII* polymorphism of the ERα gene; indicators of exposure to endogenous estrogen: age at menarche, menopause, time after menopause,

Genotype	Allele	Population	Type and size of the study	Association	OR/RR	References
ERα351 XbaI A/G	AA	Norway 27 to 94 years-old	Case/control 360/672	↑ risk for breast cancer after menopause	OR: 2.02 IC 95%: 0.96-4.31	Andersen et al. [18]
	AA	Korea	Case/control 205/205	↑ risk for breastcancer	OR: 2.38 IC 95%: 1.58-3.58	Shin et al. [6]
	AA	Korea	Case/control 205/205	↑ risk for breast cancer in nulliparous	RR: 4.0 IC 95%: 1.9-8.8	Shin et al. [6]
	AA	Netherlands and England After-menopause	Cohort prospective 791 with HT/781 no HT	↑mammographic density in HT users	2.20% p<0.01	van Duijnhoven et al. [17]
	AA	China		↑ risk for breastcancer	OR: 6.88 IC 95%: 0.80-59.15 p=0.079	Hu et al. [19]
	AA	China 25-55 years-old	Case/control	↑ risk for breast cancer, with positive family history	OR: 4.20 IC 95%: 0.65-27.28	Shen et al. [12]
	AA	Netherlands 55 years or more	Case/control 190/3513	↑ risk for breast cancer in women after menopause	OR: 1.3 IC 95%: 0.7-2.2	Ladd et al. [14]
	AA	Brazil After-menopause	Prospective 120	↑ higherbreastdensity	OR: 2.34 IC 95%:1.06-5.16 p=0.03	Ramos et al. [20]
		England	Systematic review of case-control studies	Nonsignificantdifference	P=0.06	Dunning et al. [21]
	AA	Pakistan, 15-65 years-old	Case/control 100/100	↑ of the risk of BC post menopause	AA 45% greater than GG p<0.01	Javed et al. [22]
	AA	BrazilAfter-menoppausa	Only cases 308 women	Mammographicdensity>50%	AA 33.44% greaterthan GG 16.56%	Souza et al. [16]
HaplotypXbaI-C975→G		Sweden after-menoppausa	Case/control 1556/1512	↑ risk of breast cancer in postmenopausal and obese women	OR=1.48 IC 95%: 1.17-1.88	Wedren et al. [23]
	AG	Norway 27-94 years-old	Case/control 360/672	↑ risk for breastcancer	OR: 2.00 IC 95%: 0.92-4.37	Andersen et al. [18]
	GG	USA, Caucasian greater than 65 years-old	Case/control 393/790	↓ risk for breastcancer	OR 0.82 IC 95%: 0.68-1.00 P=0.04	Wang et al. [24]
	GG	Netherlands and England After-menopause	Prospective Cohort 795 with HT/781 no HT	Mammographic density without changes in users of HT	0.65% p=0.70	van Duijnhoven et al. [17]
	A	China	Case/control 114/121	↑ risk for breastcancer	OR: 1.4 IC 95%: 1.0-1.9	Hu et al. [19]
	G	Korea	Case/control 205/205	↓ risk for breast cancer in postmenopausal	RR: 0.3 IC 95%: 0.1-0.5	Shin et al. [6]

Table 2: Association studies of the ERα-351 XbaI A/G gene polymorphism with BC and/or risk factors for disease.

Quantitativevariables	Average	Controls		HMD		Z	P
		Dp		Average	Dp		
Age		58.16	4.61	56.31	5.42	3.40	0.001*
Wast circumference	95.06	11.13		89.47	10.83	5.04	<0.001*
Number of Pregnancies	3.63	2.56		2.46	1.83	4.62	<0.001*
Number of Births		2.84	1.98	1.99	1.54	4.37	<0.001*
Number of Abortions		0.79	1.20	0.48	0.87	2.93	0.003*
Date of last menstruation		46.83	6.26	46.45	6.33	0.49	0.621
Age at first birth		21.88	5.16	24.04	6.04	3.61	<0.001*
Menarche		12.87	1.78	13.17	1.78	1.66	0.096
Time after menopause		11.33	6.42	9.85	7.38	2.69	0.007*
Qualitative variables	n	%		n	%	x²	P
BMI	Normal/overweight	81	52.3	195	63.3	5.23	0.022*
	Obese	74	47.7	113	36.7		
Smoke	No	140	90.3	264	85.7	1.97	0.161
	Yes	15	9.7	44	14.3		
Alcohol intake	No	137	88.4	258	83.8	1.76	0.185
	Yes	18	11.6	50	16.2		
Metabolic syndrome	No	104	67.1	220	71.4	0.92	0.337
	Yes	51	32.9	88	28.6		

Quantitative variables *Statistically significant difference [p<0.05]

Nonparametric Mann-Whitney test

*Qualitative variables: statistically significant difference [p<0.05]

Chi-square test

Table 3: Comparison between the two groups of Mammographic Density: HMD and controls in quantitative and qualitative variables.

High mammographic density	<i>PvuII</i>			Total	
	Pp	Pp	PP		
No	72	31	41	144	$\chi^2=7.42$
	50.0%	21.5%	28.5%	100.0%	$p=0.024^*$
Yes	147	100	61	308	OR=1.75
	47.7%	32.5%	19.8%	100.0%	IC 95%=1.10-2.79
Total	219	131	102	452	
	48.5%	29.0%	22.6%	100.0%	
	<i>XbaI</i>			Total	
	Xx	Xx	XX		
No	74	40	30	144	$\chi^2=2.03$
	51.4%	27.8%	20.8%	100.0%	$p=0.362$
Yes	154	103	51	308	OR=1.31
	50.0%	33.4%	16.6%	100.0%	IC 95%=0.85-2.02
Total	228	143	81	452	
	50.4%	31.6%	17.9%	100.0%	

Table 4: Association between mammographic densities and polymorphisms *PvuII* and *XbaI*.

number of pregnancies, age at first birth, number of births, number of abortions, FHBC, BMI, waist circumference (WC), and the variables that characterize the sample (age, race, alcohol intake, smoking). The risk associated with the p allele of the *PvuII* was high in all strata. It was observed an increased risk of having HMD for women with younger age, smaller WC, fewer pregnancies, old age at having the first birth, the higher number of women with a FHBC. There was no apparent modification effect for the other indicators of exposure to endogenous estrogens.

Likewise, it was performed the association between the x allele of the *XbaI* and the same independent variables that characterize the sample, but no results confirmed the association.

Discussion

The association of ERα gene polymorphisms with the risk of BC draws attention because the ER functions as a regulator of the hormone dependent transcription, which plays a significant role in the development of BC [10]. Indeed, approximately two thirds of BC expresses the estrogen receptor alpha. Epidemiologic studies also correlate steroid hormones to changes the MD, and have examined whether variations in genes that regulate the biosynthesis and hormonal metabolism could explain individual differences in MD. The ER gene, located in the long arm of chromosome 6q25, has been associated to HMD in many studies, due to its importance in the development, progression and prognosis of BC. Several polymorphisms of ERα gene have been reported, with the *PvuII* and *XbaI* – located in intron 1 of the ERα gene with 50 base pairs between them – being the most studied. Several diseases, including BC [6,9,10,18,30], endometrial cancer [31], Alzheimer's disease [32], obesity [33,34], endometriosis [35], leiomyomas [36] and bone mineral density [37], have been evaluated for a possible connection with ERα gene polymorphisms.

Our findings revealed a statistically significant difference between the two groups of mammographic density as the main risk factors for breast cancer that has been reported in previous studies. The risk of having HMD was increased in younger women, with a lower waist circumference, fewer pregnancies, a higher age at the first birth, and a high number of women with a family history of breast cancer. We observed that for the increase of 1 year in age, the probability of being classified as HMD as compared to controls; decreased 6.8%. The groups of women with HMD were 56.31 years old in average, while in the controls group the average age was 58.16. This relationship was

statistically significant ($p<0.001$), indicating that younger women are most likely to have HMD. These findings are in agreement with the literature, showing decrease in breast density patterns with increasing age (Stomper et al. 1996 and Boyd et al. 2007). Among the avoidable risk factors throughout life, obesity/overweight are the most important ones, since they are the main determinants of the estrogen level in women after menopause [34] and; exposure to estrogens during life is a well established factor of increased risk for BC. According to recent studies, there is a positive relationship between BMI and breast cancer, especially in postmenopausal women [38-40]. Nevertheless, women with high BMI are less likely to have HMD, even though the risk for BC development increases in women with HBD and who are obese (obese, OR=1.7: obese HBD, OR=2.01) [41]. It is also suggested that for every 5 kg of weight gain in adult life, the risk of developing BC [42] increases by 8%. Our data showed a high prevalence of obesity, but it was predominant in the control group (47.7%). Obesity was highly prevalence in the HMD group (36.7%), a surprising and worrying finding that deserves attention because of women with HBD, a factor considered as a high risk for developing BC (RR>4.0).

Our findings revealed a statistically significant difference between the two groups of mammographic density also with respect to the distribution of the *PvuII* polymorphism genotype ($p=0.024$). It was found that women with two mutated alleles (homozygous mutant) had 76% greater chances of being diagnosed with HMD, compared to those with one or two normal alleles for this polymorphism (Table 4). The risk associated with the p allele of *PvuII* was shown to be an independent risk for other indicators of high exposure to endogenous estrogens. It was not observed any apparent effect modification for other indicators of exposure to endogenous estrogens and lifestyle factors. Similarly, van Duijnhoven et al. [17] studied the influence of ERα and HT on the MD, reporting an association between increased MD and the presence of the mutated genotype ERα-397 (OR=2.24) in women using HT when compared to those with wild genotype and not HT users. Parl et al. [30] found that the pp genotype of the *PvuII* SNPs was higher in women with a diagnosis of BC at a younger age. Yaich et al. [9] examined the *PvuII* polymorphism in tumor tissue of 257 women with primary breast cancer and compared it to peripheral blood collected from 140 controls not affected by the disease. Women with BC and pp genotype had a diagnosis of BC at an earlier age compared with those with PP or Pp genotypes of the group that had cancer.

Investigating the genotype distribution of the *XbaI* polymorphism,

Independent variables	B	Standard error B	OR	OR [IC 95%]		p
Constant	7.330	1.715				
Age	-0.070	0.025	0.932	0.888	0.979	0.005
WC	-0.038	0.011	0.963	0.943	0.984	0.001
Number of pregnancy	-0.186	0.069	0.830	0.725	0.950	0.007
Age at first birth	0.052	0.025	1.053	1.004	1.106	0.035
FHBC	0.707	0.335	2.028	1.052	3.909	0.035
Mutated PvuII	0.562	0.290	1.754	0.993	3.099	0.053

Table 5: Multiple logistic regression, stepwise backward method, where the dependent variable in the HMD and independent variables are: Age, BC, Number of Pregnancy, Age at first birth, FHBC, Mutated PvuII.

the authors found that women with two mutated alleles (homozygous mutant) were 30% more likely (OR=1.31) of having HMD, though this difference was not significant ($p=0.36$). On the other hand, Andersen et al. [18], while investigating the allelic frequency of the *PvuII* and *XbaI* SNPs in 360 cases of the BC and 672 controls, found significant differences only for the *XbaI* polymorphism. The x allele frequency among women with BC was 40% higher compared to that of the controls. In a case-control study conducted in South Korea by Shin et al. [6], the OR associated with the xx genotype of *XbaI* was 2.38 compared to the XX genotype. In that same vein, Cai et al. [10], in a large population study, found a significant association between of the *PvuII* polymorphism and BC (OR=1.4). For *XbaI* SNPs, the association of risk was 1.3 and only for women after menopause.

The molecular mechanisms through which these polymorphisms alter the receptor activity are not clear because *PvuII* and *XbaI* are located in an intronic, and apparently nonfunctional, region of the gene. Possible explanations include: (a) the existence of a functional combination between polymorphic alleles, where the two markers in combination would alter the gene function, as well as the RNAm stability [23]. Thus, this study investigated if the combination of *PvuII* and *XbaI* polymorphisms increased the risk of having HMD, and did not observe any synergistic effect between them; (b) Another explanation would be that polymorphisms in intron could have a Linkage Disequilibrium (LD) with the *exon* which would affect the function of the ER as a whole [37]; in this regard, it has been investigated whether polymorphisms in intron 1 are in LD with repeat polymorphism (GT) $_n$ located at 6627 bp after the beginning of the transcription site of the *exon* 1 and to 144 kb before the *exon* 2; (c) Growth factors and their signaling molecules are important for cancer growth and its progression. There is considerable cross-talk between ER and growth factors such as insulin and IGF1 (growth factors like insulin), and the family of epidermal growth factors [43].

The allelic and genotypic frequencies obtained for the *ERα-397 PvuII* polymorphism (P=46.8%, p=53.2%) were similar to those found in other studies in which this polymorphism was correlated with MD or BC [11,13,17,19,27,29]. The genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium with the following frequencies: pp genotype 29.0%, Pp 48.5% and PP 22.6% (Table 4).

The allele frequencies for the *XbaI* polymorphism (x=56.9%, X=43.1%) were lower when compared to two other studies conducted in Brazil [20,27], but they were in accordance with the frequency found by van Duijnhoven et al. [17], Molvarec et al. [28] and Hsieh et al. [29]. The genotype distribution for *ERα-351 XbaI* was also in Hardy-Weinberg equilibrium with the following frequencies: xx genotype 31.6%, Xx 50.4% and XX 17.9% (Table 4).

In relation to the independent variables that showed association with MD (age, race, WC, menarche, menopause, time after menopause, number of pregnancies, age at the first birth, number of births, number

of abortions, FH, BMI, alcohol intake, smoking and *PvuII* and *XbaI* genotypes), after performing a multiple logistic regression, only the clinical factors (age, WC, number of pregnancies, age at the 1st birth, FH and *PvuII* polymorphism in the ERα) showed to be independent risk factors for HMD ($p<0.05$).

In summary, the present case-control study concluded that the *PvuII* polymorphism in the gene ERα was associated with an increased chance of having HMD, a factor of high risk for BC. Thus, recognizing these risk factors will be of great importance in the analyses of individual susceptibility to BC; in both the study of the response to various drugs (for example HT) and the prognosis (Table 5).

Footnote

This research was supported by the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP).

References

- Jensen EV, Jordan VC (2003) The estrogen receptor: a model for molecular medicine. Clin Cancer Res 9: 1980-1989.
- Osborne CK, Schiff R (2005) Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. J Clin Oncol 23: 1616-1622.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, et al. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. Science 231: 1150-1154.
- Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Soares-Jr JM, Barros N, et al. (2012) Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco do câncer de mama. Femina 40: 179-186.
- Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Smith JR, et al. (2005) Polymorphisms in ER-alpha gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. Clin Cancer Res 11: 1093-1098.
- Shin A, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park SK, et al. (2003) Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat 80: 127-131.
- Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BA (2008) Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. N Engl J Med 358: 2796-2803.
- Boyd NF (2011) Tamoxifen, mammographic density, and breast cancer prevention. J Natl Cancer Inst 103: 704-705.
- Yaich L, Dupont WD, Cavenier DR, Parl FF (1992) Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. Cancer Res 52: 77-83.
- Cai Q, Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, et al. (2003) Genetic polymorphisms in the estrogen receptor a gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 12: 853-859.
- Onland-Moret NC, van Gils CH, Roest M, Grobbee DE, Peeters PH (2005) The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands). Cancer Causes Control 16: 1195-1202.
- Shen Y, Li DK, Wu J, Zhang Z, Gao E (2006) Joint effects of the CYP1A1 Mspl, ERalpha PvuII, and ERalpha XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai, China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15: 342-347.

13. González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, Iglesias Pérez L, González-Perez A, et al. (2008) Analysis of the ERalpha germline PvuII marker in breast cancer risk. *Med Sci Monit* 14: CR136-143.
14. González-Zuloeta Ladd AM, Vásquez AA, Rivadeneira F, Siemes C, Hofman A, et al. (2008) Estrogen receptor alpha polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 107: 415-419.
15. Crandall CJ, Sehl ME, Crawford SL, Gold EB, Habel LA, et al. (2009) Sex steroid metabolism polymorphisms and mammographic density in pre- and early perimenopausal women. *Breast Cancer Res* 11: R51.
16. Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, de Barros N, Franzolin SO, et al. (2013) Polymorphisms of estrogen receptor- α gene in Brazilian women with high breast density after menopause. *Gynecol Endocrinol* 29: 771-774.
17. van Duijnhoven FJ, Peeters PH, Warren RM, Bingham SA, Uitterlinden AG, et al. (2006) Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 462-467.
18. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, et al. (1994) Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet* 94: 665-670.
19. Hu Z, Song CG, Lu JS, Luo JM, Shen ZZ, et al. (2007) A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER Alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/BRCA2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. *J Cancer Res Clin Oncol* 133: 969-978.
20. de Moura Ramos EH, Martinelli S, Silva I, Nazário A, Facina G, et al. (2009) Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric* 12: 490-501.
21. Dunning AM, Healey CS, Baynes C, Maia AT, Scollen S, et al. (2009) Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Hum Mol Genet* 18: 1131-1139.
22. Javed S, Ali M, Sadia S, Aslam MA, Masood AI, et al. (2011) Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. *Maturitas* 69: 377-382.
23. Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, et al. (2004) Oestrogen receptor alpha gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res* 6: R437-449.
24. Wang J, Higuchi R, Modugno F, Li J, Umblas N, et al. (2007) Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat* 106: 273-280.
25. Boyd NF (2013) Mammographic density and risk of breast cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*.
26. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, et al. (2002) Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 346: 967-974.
27. Giacomazzi J (2008) Fatores de risco para o câncer de mama e polimorfismos nos genes ER, PR e STK15 em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
28. Molvarec A, Széplaki G, Kovács M, Széplaki Z, Fazakas A, et al. (2007) Estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clin Chim Acta* 382: 100-105.
29. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, et al. (2007) Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 13: 970-974.
30. Parl FF, Cavener DR, Dupont WD (1989) Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 14: 57-64.
31. Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedrén S, Kindmark A, et al. (2000) Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* 21: 623-627.
32. Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, et al. (2000) Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 57: 236-240.
33. Speer G, Cseh K, Winkler G, Vargha P, Braun E, et al. (2001) Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and in android type obesity. *Eur J Endocrinol* 144: 385-389.
34. Souza MA, Fonseca Ade M, Bagnoli VR, Barros Nd, Neves EM, et al. (2014) The expression of the estrogen receptor in obese patients with high breast density (HBD). *Gynecol Endocrinol* 30: 78-80.
35. Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, et al. (2001) Oestrogen receptor a gene polymorphisms associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod* 16: 51-55.
36. Massart F, Becherini L, Gennari L, Facchini V, Genazzani AR, et al. (2001) Genotype distribution of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms in Italian women with surgical uterine leiomyomas. *Fertil Steril* 75: 567-570.
37. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabrò A, Becherini L, et al. (2005) Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 161: 307-320.
38. Ray A (2012) Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. *J Biosci* 37: 289-294.
39. Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, et al. (2002) Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* 13: 741-751.
40. Baer HJ, Colditz GA, Rosner B, Michels KB, Rich-Edwards JW, et al. (2005) Body fatness during childhood and adolescence and incidence of breast cancer in premenopausal women: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res* 7: R314-325.
41. Davis AA, Kaklamani VG (2011) Metabolic Syndrome and triple-negative breast cancer: A new paradigm. *International Journal Breast Cancer* 1-10.
42. Boyd NF, Greenberg C, Lockwood G, Little L, Martin L, et al. (1997) Effects at two years of a low-fat, high-carbohydrate diet on radiologic features of the breast: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 89: 488-496.
43. Burgering BM, Coffey PJ (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602.

BREAST

The expression of the estrogen receptor in obese patients with high breast density (HBD)

Marilene Alicia Souza¹, Angela de Maggio da Fonseca¹, Vicente Renato Bagnoli¹, Nestor de Barros¹, Érica Mendonça das Neves¹, Sandra Dircinha Teixeira de Araújo Moraes¹, Victor Hugo Souza Hortense², José Maria Soares¹, and Edmund Chada Baracat¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ²University Catholic of Curitiba, Parana, Brazil

Abstract

Objective: Obesity has been associated with increased risk for breast cancer (BC) mortality. Verifying in women with high breast density (HBD) post-menopausal, the frequency of polymorphisms of estrogen receptor (ER) α -PvuII, ER α -XbaI and if they influence the body mass index (BMI).

Methods: Study with 308 women with HBD post-menopause divided into two groups according to BMI: 1st group = BMI < 25 kg/m², 2nd group = BMI $\geq$ 25 kg/m². It was characterized in the clinical history: menarche, menopause, parity, family history of BC, smoking and alcohol intake.

Results: Allele and genotype frequencies for the ER α -397-PvuII and ER α -351-XbaI: P = 43.99%, p = 56.01%, pp = 32.14%, Pp = 47.73%, PP = X = 20.13% and X = 41.56%, x = 58.44%; xx = 33.44%; Xx = 50.00%; XX = 16.56%, respectively. Both PvuII and XbaI influenced BMI. When XbaI is mutated the tendency is toward higher BMI (0.039), and women with lower BMI were more frequent in PvuII genotype (p = 0.002). More frequent risk factors for BC: menarche before the age of 12 years (35.38%), nulliparity or 1st child after 28 years old (41.66%), family history of BC (19.16%) and overweight/obesity (62.01%).

Conclusion: Variations in the ER α gene affected the BMI in women with HBD, who already are at increased risk for BC.

Keywords

Breast cancer, estrogen receptors, genetic polymorphism, mammography, obesity, risk factors

History

Received 28 April 2013

Revised 30 September 2013

Accepted 23 October 2013

Published online 22 November 2013

Introduction

The World Health Organization estimates that each year occur more than 1.4 million new cases of breast cancer (BC) worldwide, making it the most common cancer among women [1]. It has been no different in Brazil, according to data from the National Cancer Institute [2]. In 2012 is expected 52 680 new cases of BC, that is, estimated risk of 52 cases per 100 000 women. These numbers, can explain why many studies have been conducted with the aim of identifying the population at greatest risk, and thereby promote public policy actions for prevention and early detection.

Among the avoidable risk factors throughout life, obesity/overweight is the most important and the main determinants of the estrogen level in women after menopause. Exposure to estrogens during life is a well-established factor of increased risk for BC and high breast density (HBD), by influencing growth, differentiation and function of target tissues, including breast, uterus and ovary [3]. Biological effects of estrogens are mediated by the binding affinity with its receptor, are members of the superfamily of nuclear receptors and control the gene transcription. The two major isoforms of estrogen receptors (ERs) are α and β . The ER α is of particular interest because its expression is increased in cells of malignant breast tumors [4], and its gene [5] is located on chromosome 6q25.1. Polymorphisms in this gene can contribute

to the development of alterations in various hormone dependent tissues and also explain individual variations in HBD and increased risk for BC [6–9]. In contrast to the numerous studies that show the impact of obesity in the prognosis of BC, the possible effect of the ER α gene polymorphisms in the BMI is unclear. In this study, was analyzed the influence of the ER α PvuII (rs2234693) and ER α XbaI (rs9340799) gene polymorphisms in the BMI in women with HBD after menopause.

Methods

Observational study of prevalence of polymorphisms ER α gene PvuII and XbaI in 308 women after menopause, divided into two groups according to BMI: 1st group comprised of 117 women of normal weight (BMI < 25 kg/m²), 2nd group with 191 obese/overweight women (BMI $\geq$ 25 kg/m²), aged 45–65 years, HBD evaluated by computerized objective method, without menstruation or hormonal therapy for at least 1 year, without personal history of BC and ovarian cancer. Initially, the patients were selected in a subjective way by the standards ACR-Birads®, by a unique reader from the Institute of Radiology, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), from January 2010 to March 2011. The selected patients were evaluated again, now objectively, by another reader as described by Boyd et al. [10]. The study was approved by the Ethics Committee for Analysis of Research Projects-CAPESq the HC-FMUSP, and all women signed informed consent. It was characterized in the clinical history and physical examination: age at menarche and menopause, parity, family history of breast

Address for correspondence: Marilene Alicia Souza, Rua Azarias Leite, 12-22, Bauru, SP, CEP 17010250, Brazil. Tel: +551432236538. Fax: +551432236538. E-mail: marilenealicia@hotmail.com

cancer, smoking, alcohol intake and BMI. Peripheral blood samples were obtained for genomic DNA extraction and determination of polymorphisms in question.

The genomic DNA was extracted from peripheral blood using QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, São Paulo, SP, Brazil), following manufacturer instructions. After DNA quality and integrity evaluation, we performed PCR-RFLP assay for Estrogen Receptor PvuII and XbaI polymorphism analysis as described by Herrington et al. [10]. The laboratory was blinded on the subject identification.

Hardy-Weinberg Equilibrium (H_W) was used to verify if the genotype frequencies of polymorphisms PvuII and XbaI in our population were in genetic equilibrium. Simple mathematical model $[(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2]$ used to calculate genotype frequencies from allele frequencies.

Statistical analysis

The data were described using average, standard deviation (SD), median, absolute frequency (*n*) and relative frequency (%). The correlation between variables was performed by multiple linear regression, and compared with the qualitative variables by "χ² test", for quantitative variables was used the "t test". When it came to more than two variables was applied the test of analysis of variance (ANOVA). The value of statistical significance was set at 5%, that is, $p < 0.05$. Analyses were performed using the statistical program PAST version 2.15.

Results

The allele frequencies (Table 1) obtained from polymorphisms ERα-397-PvuII and ERα-351-XbaI were: P = 43.99%; p = 56.01% and X = 41.56%; x = 58.44% and the genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium with the following frequencies: genotype pp (32.14%); Pp (47.73%); PP (20.13%) and genotype xx (33.44%); Xx (50.00%) and XX (16.56%).

Table 1. Distribution of polymorphisms with verification of Hardy-Weinberg equilibrium.

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

ns, no significant difference to the H-W equilibrium.

Table 2. Multiple linear regression with BMI as the dependent variable and PvuII and XbaI as independent variables.

Independent variables	<i>B</i>	Standard error <i>B</i>	Beta	<i>t</i>	<i>p</i>
Constant	27.129	0.375			
Pvu II	-2114	0.678	0.129	-3.120	0.002*
Xba I	1397	0.673	0.041	2.077	0.039*

*Statistically significant ($p < 0.05$).

Both PvuII and XbaI influenced significantly the BMI showed in Table 2. As the signal of B in the PvuII was negative, it indicates that when the PvuII is mutate the BMI tends to be lower ($p = 0.002$). As for XbaI, the signal of B was positive, so when XbaI is mutated the tendency is toward higher BMI (0.039).

Table 3 shows the genotype associations ERα397-PvuII and ERα351-XbaI with known risk factors for BC and high MD. There was significant difference only with BMI, but in absolute numbers there was higher prevalence of reproductive and environmental risk factors in women with mutated homozygous than heterozygous/wild homozygous.

Discussion

The prevalence of obesity in the western world has been great increase in recent years, and it is considered a global epidemic by the World Health Organization. In USA, the obesity increased from 14.2% (1978) to 34% in 2006 [1]. In Brazil the prevalence of overweight and obesity is higher among females reaching worrying levels, since more than half of women in the southeast region [11] aged between 40 and 79 years have a BMI > 25 kg/m². This epidemiological scenario of the non-transmittable chronic disease group, shows that obesity stands out as both a disease and also a risk factor for other diseases, such as chronic hypertension.

Table 3. Polymorphism of ER-α PvuII and XbaI.

	Polymorphism of ER- α PvuII		Polymorphism of ER α -XbaI	
	pp <i>n</i> (%)	Pp or PP <i>n</i> (%)	Xx <i>n</i> (%)	XX <i>n</i> (%)
Race/ethnicity				
Asian	7 (46.67)	8 (53.33)	5 (33.30)	10 (66.67)
Caucasian	55 (30.56)	125 (69.44)	62 (34.44)	118 (65.56)
Afro-Brazilian	37 (32.74)	76 (67.72)	36 (31.85)	77 (68.14)
	<i>p</i> = 0.618		<i>p</i> = 0.286	
Number of births				
0	23 (33.82)	45 (66.18)	25 (36.76)	43 (63.24)
1–3	65 (32.83)	133 (67.17)	62 (31.31)	136 (68.69)
>3	12 (28.57)	30 (71.43)	16 (38.10)	26 (61.90)
	<i>p</i> = 0.835		<i>p</i> = 0.563	
Date of the last menstruation				
Up to 50 years	77 (33.33)	154 (66.67)	76 (32.90)	155 (67.10)
>50 years	23 (29.97)	54 (70.13)	27 (35.06)	50 (64.94)
	<i>p</i> = 0.574		<i>p</i> = 0.727	
Age at having the first child				
Up to 28 years	57 (29.53)	136 (70.47)	62 (32.12)	131 (67.88)
>28 years	20 (42.55)	27 (57.45)	16 (34.04)	31 (65.96)
	<i>p</i> = 0.086		<i>p</i> = 0.801	
Age of menarche				
Up to 12 years	36 (33.03)	73 (67.97)	37 (33.94)	72 (66.06)
>12 years	64 (32.16)	135 (67.84)	66 (33.17)	133 (66.83)
	<i>p</i> = 0.877		<i>p</i> = 0.890	
Smoke				
Not	83 (31.44)	181 (68.56)	88 (33.33)	176 (66.67)
Yes	17 (38.64)	27 (61.36)	15 (34.09)	29 (65.91)
	<i>p</i> = 0.345		<i>p</i> = 0.921	
Alcohol				
Not	83 (32.27)	175 (67.73)	87 (33.72)	171 (66.28)
Yes	17 (34.00)	33 (66.00)	16 (32.00)	34 (68.00)
	<i>p</i> = 0.800		<i>p</i> = 0.813	
Family history				
Not	83 (33.33)	166 (66.67)	86 (34.54)	163 (65.46)
Yes	17 (28.81)	42 (71.19)	17 (28.81)	42 (71.19)
	<i>p</i> = 0.505		<i>p</i> = 0.402	
Body Mass Index				
Normal	46 (39.32)	71 (60.68)	36 (30.77)	81 (69.23)
Overweight	21 (26.92)	57 (73.08)	25 (32.05)	53 (67.95)
Obese	33 (29.20)	80 (70.80)	42 (37.17)	71 (62.83)
	<i>p</i> = 0.002		<i>p</i> = 0.039	

Material may be protected by copyright law (Title 17, U.S. Code)

diabetes mellitus, cardiovascular diseases and neoplasms [12]. According to recent studies they have shown a positive relationship between BMI and breast cancer, especially in post-menopausal women [13–15]. Women with high BMI are less likely to have dense breasts, however, the risk for BC development increases in women with HBD and obese (obese, OR = 1.7; obese HBD, OR = 2.01) [16]. It is also suggested that for every 5.00 kg weight gain in adult life, the risk of developing BC [17] increases by 8%. High caloric intake, especially saturated fat, is related to increased risk for BC, and changes in diet, limiting consumption of saturated fat and carbohydrates, can decrease the risk of BC and HBD [16].

In our study, overweight/obesity was highly prevalent (62%), a surprising and worrying data that deserves attention because the sample was consisted of only women with HBD, a factor considered at high risk for developing BC (RR > 4.0). In the group ER α -XbaI-351 mutated homozygous (xx), there was significant difference between obese and normal-weight women ($p = 0.039$), this result suggests greater expression of XbaI polymorphism in obese patients. On the other hand, for the PvuII polymorphism was found inverse relationship, lower BMI greater expression of this polymorphism ($p = 0.002$). Previous studies, searching for genetic factors to explain obesity, found a positive relationship of these polymorphisms with weight and body fat distribution [18–20]. In the same sense, Wedrén et al. [21], analyzed the relationship of polymorphic variants in the ER α gene, BC and risk factors, and concluded that there was positive relationship of these polymorphisms with BC only in women with a high BMI (XbaI = 1.41; PvuII = 1.48). Our data confirmed the data of others researches as the article published by Esfahlan et al. [22], in which they concluded that the expression of ER α was significantly higher in obese patients, factor that influenced the progression and proliferation of breast cancer cells ($p = 0.001$). The BC is a heterogeneous disease and risk factors may be differentially associated with the development of distinct subtypes of tumors. In our data, we observe that the PvuII polymorphism was associated with lower weight women. However, there was no significant influence with early menopause, family history of BC and having the 1st child after 28 years old. Different results were observed by González-Mancha et al. [8], who concluded that PvuII was more frequent in women with BC who had a family history of BC (OR = 3.81) were premenopausal (OR = 1.49), however, there was no significant association with BMI. In our study was observed in the presence of genotype ER α -351-XbaI AA (homozygous mutant), that the most influential factor was the BMI, and other considered risk factors for BC (early menarche, late menopause, nulliparity or birth the 1st child after 28 years old) showed no significant differences in this genotype.

Conclusion

Variations in the ER α gene affected the BMI in women with HBD, who already are at increased risk for BC. This observation shows the importance of public preventive education measures in encouraging changes in eating habits, as effective strategy for reducing the BC.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article. FAPESP – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process: 2009/54563/0).

References

1. WHO, 2012. News releases 2010. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010> [last accessed Mar 2012].
2. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Available from: <http://www.inca.gov.br> [last accessed 2012].
3. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 2003;9:1980–9.
4. Allred DC, Brown P, Medina D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:240–5.
5. Cai Q, Shu XO, Jin F, et al. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor α gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:853–9.
6. van Duijnhoven FJB, Peeters PHM, Warren RML, et al. Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:462–7.
7. Ramos EHM, Martinelli S, Silva I, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric* 2009;1:490–501.
8. González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, et al. Analysis of the ER alpha germline PvuII marker in breast cancer risk. *Med Sci Monit* 2008;14:136–43.
9. Javed S, Ali M, Sadia S, et al. Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. *Maturitas* 2011;69:377–82.
10. Boyd NF, Martin LJ, Bronskill M, et al. Breasts tissue composition and susceptibility to breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1224–37.
11. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 2002;346:967–74.
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [site internet]. Diretoria e pesquisa. Departamento de População e Indicadores Sociais. Available from: <http://www.datasus.gov.br/> [last accessed 2012].
13. Ray A. Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. *J Biosci* 2012;37:289–94.
14. Morimoto LM, White E, Chen Z. Obesity, body size, and risk of post menopausal breast cancer. *Cancer Causes Control* 2002;13:741–51.
15. Baer HJ, Colditz A, Rosner B, et al. Body fatness during childhood and adolescence and incidence of breast cancer in premenopausal women: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res* 2005;7:314–25.
16. Davis AA, Kaklamani VG. Metabolic syndrome and triple-negative breast cancer: a new paradigm. *Int J Breast Cancer* 2012;2012:809291.
17. Boyd NF, Greenberg C, Lockwood G, et al. Effects at two years of a low-fat, high-carbohydrate diet on radiologic features of the breast: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:488–96.
18. Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Ega KM, et al. Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2000;11:533–42.
19. Xu H, Xizo W, Luo D, et al. Association analysis of genetic polymorphisms and potential interaction of the oestocalcin (BGP) and ER-A genes with body mass index (BMI) in premenopausal Chinese women. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31:455–60.
20. Deng H-W, Li J, Dowd R, et al. Association of estrogen receptor- α genotypes with body mass index in normal healthy postmenopausal Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2748–51.
21. Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, et al. Oestrogen receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res* 2004;6:437–49.
22. Esfahlan RJ, Zarghami N, Esfahlan AJ, et al. The possible impact of obesity on androgen, progesterone and Estrogen Receptors (ER α and ER β) Gene Expression in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Basic Clin Res* 2011;5:227–37.

ORIGINAL ARTICLE

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

Marilene Alícia Souza¹, Angela Maggio Fonseca¹, Vicente R. Bagnoli¹, Nestor de Barros², Solange O.B. Franzolin³, Katia C. Carvalho¹, José Maria Soares-Jr⁴, and Edmund C. Baracat⁵

¹Obstetrics and Gynecology, ²Radiology, Sao Paulo University, Bauru, Brazil, ³Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil, ⁴Federal University of São Paulo, Gynecology, São Paulo, Brazil, and ⁵Hospital das Clínicas de São Paulo, Ginecologia, São Paulo, Brazil

Abstract

The association of genetic polymorphism in the estrogen receptor alpha (ER α) gene and risk for diseases including breast cancer (BC) has been the subject of great interest.

Objective: Checking on women with high breast density after menopause, the frequency of the *PvuII* and *XbaI* polymorphisms of the ER α gene and the correlation between them and the known risk factors for breast cancer.

Method: Observational study with 308 women between 45 and 65 years old with high breast density, without hormonal therapy, menstruation for a year or more, breast and ovarian cancer history. It was characterized in clinical history and physical examination: menarche, menopause, parity, family history of BC, smoking, alcohol intake and body mass index.

Results: The allelic and genotypic frequencies for ER α -*PvuII* and *XbaI*: $p = 43.99\%$; $p = 56.01\%$; $pp = 32.14\%$; $Pp = 47.73\%$ and $PP = 20.13\%$; $X = 41.56\%$; $x = 58.44\%$; $xx = 33.44\%$; $Xx = 50.00\%$ and $XX = 16.56\%$, respectively. The most frequent risk factors for BC: menarche before 12 years old (35.38%), nulliparity or first child after 28 years old (41.66%), family history of BC (19.16%) and overweight/obesity (62.01%).

Conclusion: Allelic and genotypic distribution similar to literature. The risk factors for BC were more prevalent in women with high breast density but without significant associations with these polymorphisms.

Keywords

Breast neoplasms, estrogen receptors, genetic polymorphism, mammography, risk factors

History

Received 4 September 2012

Revised 2 December 2012

Accepted 29 April 2013

Published online 6 June 2013

Introduction

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

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

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

The Association of genetic polymorphisms in the ER α gene and risk of disease including the BC has been a object of great

interest [6–9]. The aim of this study is to verify the frequency of polymorphisms of ER α *PvuII* and *XbaI* in women with high breast density after menopause.

Method

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

The genomic DNA was extracted from peripheral blood using QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen), following manufacturer instructions. After DNA quality and integrity evaluation, we performed PCR-RFLP assay for Estrogen Receptor *PvuII* and *XbaI* polymorphism analysis as described by Herrington et al. (2002) [10].

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

Address for correspondence: Marilene Alícia Souza, Sao Paulo University, Obstetrics and Gynecology, rua Azarias Leite 1222, Bauru, 17010250 Brazil. E-mail: marilenealicia@hotmail.com

Table 1. Description of qualitative variables.

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

Statistical analysis

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

The analyses were performed using the statistical program PAST version 2.15. The comparison of qualitative variables was obtained by testing χ^2 ; for quantitative variables were used “*t*-test”. When it came to more than two variables it was applied the test of analysis of variance (ANOVA). The value of statistical significance was set at 5%, i.e. $p < 0.05$.

Results

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

The average age was quite high (56.31 years), because 170 women in this group were over 56 years old. The allele frequencies (Table 2) obtained for *ERα*-397-*PvuII* and *ERα*-351-*XbaI* polymorphisms were: $p = 43.99\%$, $p = 56.01\%$ and $X = 41.56\%$; $x = 58.44\%$. The genotypic distribution was in *H-W* equilibrium with the following frequencies: genotype *pp* (32.14%); *Pp* (47.73%); *PP* (20.13%) and for *xx* genotype (33.44%); *Xx* (50.00%) and *XX* (16.56%).

Table 2. Distribution of polymorphisms with verification of Hardy-Weinberg equilibrium.

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

ns-difference not significant for the *H-W* equilibrium.

The Table 3 shows the genotype associations *ERα*-397-*PvuII* and *ERα*-351-*XbaI* with known risk factors for BC and high MD. There was no statistically significant difference, but in absolute numbers, there was higher prevalence of reproductive and environmental risk factors in women with mutated homozygous than wild homozygous.

Discussion

The polymorphism is a genetic variation of usual occurrence in the general population, found in frequency higher than 1%. There are several known polymorphisms of estrogen receptor alpha gene (*ERα*), some of which can modify the function of the receptor and the action of estrogens. Among the known polymorphisms, *PvuII* and *XbaI*, may be involved with increased individual risk for BC and high MD after menopause [4].

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

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

The molecular mechanisms by which these polymorphisms alter the activity of the receptor are not clear since *PvuII* and *XbaI* are located in a intronic region, and apparently non-functional of the gene. Possible explanations include the existence of functional combination among polymorphic alleles where the two markers in combination would change the genetic function as well as the stability of RNA [11]. Another explanation would be that polymorphisms in *intron* could have a linkage Disequilibrium (LD) with the *exon* which would affect the function of the *ER* [12]. In this sense Shen et al. studied together the genotypes *ERα* *XbaI*, *ERα* *PvuII*, *CYP1A1* *MspI* with the aim of assessing whether

Table 3. Polymorphism of *ER- α PvuII* and *XbaI*.

	Polymorphism of <i>ER-α PvuII</i>		Polymorphism of <i>ER-α XbaI</i>	
	<i>pp</i> n (%)	<i>Pp</i> or <i>PP</i> , n (%)	<i>xx</i> , n (%)	<i>Xx</i> or <i>XX</i> , n (%)
Race/Ethnicity				
Asian	7 (46.67)	8 (53.33)	5 (33.30)	10 (66.67)
Caucasian	55 (30.56)	125 (69.44)	62 (34.44)	118 (65.56)
Afro-Brazilian	37 (32.74)	76 (67.22)	36 (31.85)	77 (68.14)
	$p = 0.618$		$p = 0.286$	
Number of births				
0	23 (33.82)	45 (66.18)	25 (36.76)	43 (63.24)
1 to 3	65 (32.83)	133 (67.17)	62 (31.31)	136 (68.69)
>3	12 (28.57)	30 (71.43)	16 (38.10)	26 (61.90)
	$p = 0.835$		$p = 0.563$	
Date of the last menstruation				
Up to 50 years	77 (33.33)	154 (66.67)	76 (32.90)	155 (67.10)
>50 years	23 (29.97)	54 (70.13)	27 (35.06)	50 (64.94)
	$p = 0.574$		$p = 0.727$	
Age at having the first child				
Up to 28 years	57 (29.53)	136 (70.47)	62 (32.12)	131 (67.88)
>28 years	20 (42.55)	27 (57.45)	16 (34.04)	31 (65.96)
	$p = 0.086$		$p = 0.801$	
Age of menarche				
Up to 12 years	36 (33.03)	73 (67.97)	37 (33.94)	72 (66.06)
>12 years	64 (32.16)	135 (67.84)	66 (33.17)	133 (66.83)
	$p = 0.877$		$p = 0.890$	
Smoke				
Not	83 (31.44)	181 (68.56)	88 (33.33)	176 (66.67)
Yes	17 (38.64)	27 (61.36)	15 (34.09)	29 (65.91)
	$p = 0.345$		$p = 0.921$	
Alcohol				
Not	83 (32.27)	175 (67.83)	87 (33.72)	171 (66.28)
Yes	17 (34.00)	33 (66.00)	16 (32.00)	34 (68.00)
	$p = 0.800$		$p = 0.813$	
Family history				
Not	83 (33.33)	166 (66.67)	86 (34.54)	163 (65.46)
Yes	17 (28.81)	42 (71.19)	17 (28.81)	42 (71.19)
	$p = 0.505$		$p = 0.402$	
Body mass index				
Normal	46 (39.32)	71 (60.68)	36 (30.77)	81 (69.23)
Overweight	21 (26.92)	57 (73.08)	25 (32.05)	53 (67.95)
Obese	33 (29.20)	80 (70.80)	42 (37.17)	71 (62.83)
	$p = 0.126$		$p = 0.563$	

the susceptibility of these three haplotypes had cumulative effects for the risk of breast cancer [13]. Their results showed that the combination of allelic variants of three *locus* has increased the risk of breast cancer even more (OR = 8.07).

In our study, the allele frequencies and genotypic obtained for polymorphism *ER- α -397-PvuII* ($p = 43.99\%$; $p = 56.01\%$) were similar to those found in other studies that correlated this polymorphism with MD or BC [6,8,14–17]. The genotypic distribution was in H-W equilibrium with the following frequencies: genotype *pp* 32.14%; *Pp* 47.73% and *PP* 20.13%. However, the allele frequencies for the polymorphism *XbaI* ($X = 41.56\%$; $x = 58.44\%$) were lower when compared with the other two studies in the Brazilian population [7,17], but it was according to the frequency found by van Duijnhoven et al., Molvarec et al. and by Hsieh et al. [4,16,18]. The genotypic distribution to *ER- α -351-XbaI* was also in H-W equilibrium with the following frequencies: *xx* genotype 33.44%; *Xx* 50.00% and *XX* 16.56%.

In relation to known risk factors for BC and MD, we noted that the homozygous recessive genotype to *PvuII* was influenced by reproductive factors. In the mutated homozygous group (*pp*) the percentage of nulliparous and women who had their first child at full term after 28 years old were 42.55% and 33.82%, respectively. According to the literature, nulliparous women present risk for BC equal to those with birth of first child after 28 years old [19].

This genotype, in absolute terms, presented early menopause. These data are in concordance to what Gonzales-Mancha et al., who researched the association SNPs *PvuII* and BC in women with menopause at the average age of 47.94 years old.

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

A data that also drew attention was the number of women with a FH of BC. In the total sample, 19.16% had a first-degree relative with BC and when we stratify to *PvuII* and *XbaI* this percentage rises to 28.81%. This shows the importance of hereditary factor of

polymorphism that are according to the literature as noted by Shen et al., who found positive association of these polymorphisms only in women with FH for BC: genotype *pp* without FH and with FH (OR = 1.12 and 3.04) and *xx* genotype (OR = 0.99 and 4.20), respectively.

For the *Xbal* polymorphism the reproductive factors were also more prevalent in absolute numbers, but no statistically significant difference. Nulliparity (36.76%) and age by having the first child after 28 years old (34.04%). Differently from *Pvull*, menopause after 50 years-old was present in 35.06% in this genotype, against 32.90% before 50 years old. Javet et al., combining the effects of the age of menopause, *Xbal* and *Pvull* polymorphisms and the occurrence of BC concluded that the genotype *Xbal* was 45% higher in cases of BC.

Investigating the combination of *Pvull* and *Xbal* polymorphisms in this study was found that these were in Linkage Disequilibrium ($D' = 0.396$). It was observed that the haplotype *ppxx* (20.13%), which is theoretically the highest risk for the increase of MD and BC, was more prevalent than the haplotype of lower risk *PPXX* (14.61%).

Conclusion

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

Declaration of interest

This study was funded by FAPESP – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process: 2009/54563-0).

References

- WHO, 2012. Available from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010> [last accessed Mar 2012].
- Martin LJ, Boyd NF. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res* 2008;10:1–14.
- Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clinical Cancer Res* 2003;9:1980–9.
- Cai Q, Shu XO, Jin F, et al. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor α gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:853–9.
- Allred DC, Brown P, Medina D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:240–5.
- Van Duijnhoven FJB, Peeters PHM, Warren RML, et al. Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:462–7.
- Ramos EHM, Martinelli S, Silva I, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric* 2009;1:490–501.
- González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, et al. Analysis of the $ER\alpha$ germline *Pvull* marker in breast cancer risk. *Med Sci Monit* 2008;14:136–43.
- Javed S, Ali M, Sadia S, et al. Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. *Maturitas* 2011;69:377–82.
- Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 2002;346:967–74.
- Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, et al. Oestrogen receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res* 2004;6:437–49.
- Gennari L, Merlotti D, Paola VD, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;161:307–20.
- Shen Y, Li DK, Wu J, et al. Joint effects of the CYP1A1 MspI, $ER\alpha$ *Pvull* and $ER\alpha$ *Xbal* polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:342–7.
- Hu Z, Song CG, Lu JS, et al. A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of $ER\alpha$, COMT and CYP19 gene in BRCA1/2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:969–78.
- Onland- Moret NC, van Gils CH, Roest M, et al. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk. *Cancer Causes and Control*. 2005;16:1195–202.
- Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 2007;13:970–4.
- Giacomazzi J. Fatores de risco para o câncer de mama e polimorfismos nos genes ER , PR e $STK15$ em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.
- Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M. Estrogen receptor alpha ($ESR1$) *pval* and *Xbal* gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clinica Chimica Acta* 2007;382:100–5.
- Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res* 2006;8:43–54.
- Barlow WE, Hite E, Ballard-Barbash R, et al. Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst* 2006;17:1204–14.
- Pichard C, Plu-Bureau G, Neves-e Castro M, Gompel A. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas Eur Menopause J* 2008;60:19–30.
- Jeon JH, Kang JH, Kim Y, et al. Reproductive and hormonal factors associated with fatty on dense breast patterns among Korean women. *Pubmed Cancer Res Treat* 2011;43:42–8.

Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco do câncer de mama

Gene estrogen receptor polymorphism as a risk factor in the breast cancer

Marilene Alcía Souza¹
Angela Maggio da Fonseca²
Vicente Renato Bagnoli²
José Maria Soares Junior³
Nestor de Barros⁴
Solange de O. B. Franzolin⁵
Edmund Chada Baracat⁶

Palavras-chave

Polimorfismo genético
Neoplasias da mama
Fatores de risco
Receptores estrogênicos
Mamografia

Keywords

Polymorphism, genetic
Breast neoplasms
Risk factors
Receptors, estrogen
Mammography

Resumo

Polimorfismo é uma variação genética de ocorrência habitual na população em geral, encontrado em frequência superior a 1%. Há vários polimorfismos conhecidos no gene do receptor de estrogênio alfa (RE α), alguns dos quais podem modificar a função do receptor e a ação do estrogênio. Entre os polimorfismos conhecidos, PvuII, XbaI podem estar envolvidos com maior risco individual ao câncer de mama e à sobrevida em mulheres após a menopausa. O objetivo foi revisar publicações sobre a associação entre mutações em genes do RE α com o risco para câncer de mama, nos últimos 20 anos. Este estudo revisou a literatura de 1990 a março de 2011 e analisou a associação entre polimorfismos do gene do RE α e o risco de câncer de mama, nas principais bases de dados. Foram identificados 17 estudos caso-controle randomizados, duas revisões sistemáticas e uma metanálise que examinaram a frequência dos referidos alelos no risco de câncer de mama. As evidências mostram que fatores hormonais, em conjunto com fatores genéticos, podem aumentar a suscetibilidade individual para o câncer de mama. No entanto, é interessante observar que após estratificação para fatores já conhecidos, que levam à alta exposição ao estrogênio durante a vida, observa-se aumento de risco principalmente em mulheres após a menopausa.

Abstract

The polymorphism is a genetic variation that occurs in the general population, found with frequency of more than 1%. There are several known polymorphisms in the estrogen receptor alpha (ER α) gene, some of which can change the receptor function and the estrogen action. Among the known polymorphisms, PvuII and XbaI can be involved with a bigger individual risk of breast cancer and survival rate in postmenopausal women. The aim was to review the publications about the association between mutations in ER α gene with the risk for breast cancer in the last 20 years. This study reviewed the literature from 1990 to march, 2011 and analyzed the association between the polymorphism of the ER α gene and the risk of breast cancer in the main database. With identified 17 randomized case-control-studies, two systematic reviews and one meta-analysis that examined the frequency of the referred alleles in the risk of the breast cancer. The evidences showed that hormonal factors together with genetic factors could increase the individual susceptibility for the risk of breast cancer. However, it is interesting to observe that after stratification to the already known factors that lead to high exposition to the estrogen during the life, notice an increase of the risk mainly in women after the menopause.

¹Pós-graduanda na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

²Livre-docente em Ginecologia pela Faculdade de Medicina da USP; Professor Associado da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

³Livre-docente pela Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) – São Paulo (SP), Brasil; Professor Associado da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

⁴Doutor em Radiologia pela Faculdade de Medicina da USP; Chefe do Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

⁵Doutora em Fisiopatologia e em Clínica Médica pela Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu (SP), Brasil; Professora Associada da Universidade Sagrado Coração (USC) – Bauru (SP), Brasil.

⁶Livre-docente em Ginecologia pela Faculdade de Medicina da USP; Professor Titular da Clínica Ginecológica da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Marilene Alcía Souza – Rua Azarias Leite, 12-22 – Vila Mesquita – CEP: 17010-250 – Bauru (SP), Brasil – E-mail: marilenealcia@hotmail.com

Introdução

A Organização Mundial de Saúde estima que, por ano, ocorram mais de um milhão de casos novos de câncer de mama em todo o mundo, o que o torna o câncer mais comum entre as mulheres. A cada ano, 22% dos casos novos de câncer, em mulheres, são de mama¹ (A).

No Brasil, não é diferente, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA)² (A), em 2012, esperam-se 52.680 novos casos de câncer de mama, ou seja, incidência aproximadamente de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Ainda, de acordo com o INCA, na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com prevalência de 69 casos novos por 100 mil mulheres. Entre as principais capitais do país, São Paulo, com 5.760 casos novos, é o local onde a incidência do câncer de mama é maior² (A). Diante desses números, muitos estudos vêm sendo realizados, no intuito de identificar a população de maior risco para câncer de mama, e desta forma, promover ações de políticas públicas.

Estudos epidemiológicos sugerem que fatores ambientais devem contribuir para o aumento da incidência do câncer de mama³ (A), e diferenças genéticas podem estar também associadas a variações individuais na suscetibilidade ao câncer de mama⁴ (B). Dentre os aspectos genéticos, 10 a 15% dos cânceres de mama têm história familiar positiva para a doença, sendo que 5% podem ser explicados pelas raras, mas de alta penetrância, mutações gênicas BRCA1 e BRCA2. Isto sugere que há outras variações genéticas comuns, de baixa penetrância que influenciam na predisposição para esta neoplasia⁵ (A).

Revisar publicações sobre a associação entre mutações em genes do receptor estrogênio alfa (RE α) com o risco para câncer de mama, nos últimos 20 anos, e conhecer sobre suscetibilidade genética, polimorfismos no gene do RE α relacionado à ocorrência de câncer de mama foram os objetivos do presente trabalho.

Metodologia

Este trabalho foi elaborado a partir de criteriosa revisão da literatura, por meio de pesquisa das publicações em periódicos indexados nas bases de dados, de 1990 a março de 2011, usando os termos: polimorfismos genéticos, câncer de mama, fatores de risco, receptores estrogênicos e mamografia. As principais bases de dados pesquisadas foram: *Cochrane Database of Systematic Reviews*, MEDLINE, Embase, *Centre for Reviews and Dissemination (CRD) website*, *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE) online database*. Os critérios de inclusão para os estudos encontrados foram: serem estudos caso-controle randomizados e de autores reconhecidos pela comunidade (citados em outros artigos sobre o tema em questão) e artigos de revisão sistemática. Foram selecionados 17 estudos caso-controle randomizados, duas revisões sistemáticas e uma metanálise que examinaram a frequência dos referidos alelos no risco de câncer de mama.

Suscetibilidade Genética para o Câncer de Mama

As neoplasias malignas surgem em decorrência de alterações no código genético, as quais conferem vantagens de crescimento às células alteradas conduzindo-as à formação de tumores e posteriormente, à metastatização; resultado do acúmulo (Figura 1) progressivo de modificações no DNA⁶ (A).

As primeiras evidências de que o câncer é uma doença genética vieram de exames microscópicos de células tumorais, nos quais foi verificada a presença de uma série de alterações na estrutura dos cromossomos. No entanto, somente nas últimas décadas, com o avanço das técnicas de manipulação do DNA e detecção de mutações, os genes afetados por esses rearranjos cromossômicos puderam ser identificados.

Nesse sentido, o estudo das bases moleculares da formação e progressão dos tumores gerou o conceito de que o câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo progressivo de mutações

Figura 1 - Mecanismos envolvidos no controle da divisão celular.

somáticas em genes que codificam proteínas envolvidas na regulação da proliferação celular⁷ (A).

Os mecanismos moleculares envolvidos nas neoplasias malignas da mama são complexos e compreendem alterações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Enquanto os proto-oncogenes (por exemplo, estrógenos) regulam positivamente o ciclo celular, os genes supressores de tumor desempenham o papel regulatório negativo na proliferação celular (por exemplo, TP53). Mutações nesses genes podem ter efeito recessivo ao nível celular, com perda de função, ou efeito dominante-negativo, onde a proteína mutante inativa a proteína normal⁸ (A).

As mutações podem ocorrer tanto em células de linhagem germinativas (câncer hereditário), quanto em células somáticas (câncer esporádico). Cerca de 90% dos cânceres de mama são esporádicos, sem nenhum caráter familiar. Portanto, apesar do câncer ser considerado uma doença genética, ele não é necessariamente uma doença hereditária.

O câncer de mama hereditário representa 10 a 15% de todos os casos de câncer de mama diagnosticados. A análise de famílias com vários casos de câncer de mama e ovário levou à identificação de genes de alto risco que incluem: BRCA1, BRCA2, TP53 e PTEN. Indivíduos que apresentam mutações nesses genes de linhagem germinativa possuem risco elevado de desenvolver câncer em idade precoce (antes da menopausa) e são geralmente receptor estrogênico negativo. A suscetibilidade desses genes na população, em geral, é rara⁹ (A).

Portanto, a maioria dos casos de câncer de mama não é explicada por alterações em genes de alta penetrância, mas sim, por alterações mais prevalentes, porém de baixa penetrância, também chamados de genes de suscetibilidade, com participação isolada pequena, mas que interagem entre si e também com fatores ambientais. O genoma dos indivíduos é idêntico

em 99%, com apenas 1% do genoma apresentando variações. Quando uma variante genética atinge frequência superior a 1% em uma população, denomina-se de polimorfismos¹⁰ (A).

Polimorfismo do Receptor de Estrogênio e Câncer de Mama

Os esteroides sexuais, principais reguladores da cinética do lóbulo mamário, são lipossolúveis, penetram passivamente no citoplasma e interagem com seus receptores. Estrógenos influenciam no crescimento, diferenciação e funcionamento de muitos tecidos-alvo, incluindo mama, útero e ovários¹¹ (A). Muitos fatores de risco para o câncer de mama (menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gravidez após os 30 anos, entre outros) são fatores influenciados pela exposição, durante a vida, aos hormônios estrogênicos¹² (A).

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

Entre os receptores estrogênicos, o RE α é de especial interesse porque sua proteína está elevada em células de tumores malignos da mama¹³ (B). Nesse mesmo sentido, em 1991, Zuppan et al.¹⁴ (B), encontraram a proteína do RE em aproximadamente 70% nas mulheres com câncer de mama após a menopausa, mas somente em 30% das mulheres, com câncer na pré-menopausa, e complementam que a presença do RE, é associada com tumor sensível ao tratamento hormonal e com prognóstico favorável.

A estrutura da proteína do RE está demonstrada na Figura 2.

Ding et al.¹⁵ (B) relataram que a expressão do RE α tem papel importante na tumorigênese da mama, por ser um importante mediador da resposta humoral e estar envolvido em

Figura 2 - Estrutura dos receptores de estrógeno alfa e beta.

inúmeras ações dos estrogênios em células-alvo, ao induzir, de modo direto, genes associados com o controle da proliferação e apoptose celular, como ciclina D1, TGF α , IGF1 e também em receptores de progesterona.

Muitas variações na sequência do gene do RE α já foram relatadas e estas podem ser responsáveis por diferentes variantes alélicas da proteína, alterando sua função e atividade e, dessa forma, o efeito dos estrógenos sobre o desenvolvimento do câncer de mama¹⁶ (A).

Mapa genético do gene do receptor estrogênico tem revelado a existência de vários sítios de polimorfismos¹⁷ (A). Os polimorfismos genéticos mais estudados do RE α são os polimorfismos de nucleotídeo único, os *single nucleotide polymorphism* (SNP), PvuII e XbaI localizado no íntron 1 (Figura 3).

Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos PvuII e XbaI

Os SNP são analisados pela técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e sequenciamento. O RFLP PvuII detecta a substituição T-C na posição - 397 antes do éxon 2 que é referido como T-397int1C, enquanto o RFLP XbaI detecta G-351intA¹⁸ (B). Na literatura, o alelo C do RE α -397 PvuII é denominado como P e o alelo G de RE α -351 XbaI como X, ambos em abstenção de sítios de restrição. O alelo T de ER α -397 PvuII é denominado como p e o alelo A de RE α -351 XbaI como x, ambos apresentando sítios de restrição¹⁷ (A).

Há duas cópias em cada genoma, portanto há três possibilidades de combinação entre os alelos: dois de baixo risco; um de baixo risco e outro de alto risco; e dois de alto risco. O risco conferido por cada um destes alelos parece ser alelo dose-locos dependente¹⁹ (A). Em diferentes estudos estes polimorfismos têm sido associados com varias condições patológicas tais como: câncer de mama, câncer de próstata, osteoporose, endometriose e doenças cardiovasculares²⁰⁻²² (A, B, B). No entanto, resultados ainda são conflitantes e o mecanismo molecular pelos quais esses polimorfismos influenciam a atividade dos receptores não são claros¹⁷ (A).

Alguns estudos que associam os polimorfismos do gene do RE α PvuII e XbaI estão relacionados nas Tabelas 1 e 2.

Discussão

A partir do estudo de Zuppan et al.¹⁴ (B), que relacionou polimorfismos do gene do receptor estrogênico e câncer de mama de ocorrência após os 50 anos de idade em 11 famílias com vários casos de câncer de mama, provocou interesse a novas pesquisas. Assim, Andersen et al.³² (B), sabendo que polimorfismos em genes do RE poderiam representar biomarcadores para suscetibilidade ao câncer de mama, pesquisaram a associação entre eles e encontraram que, na população com câncer de mama, a presença do genótipo XbaI foi associada com doença tardia (p=0,033).

Figura 3 - Estrutura dos domínios funcionais e descrição dos polimorfismos do gene receptor de estrógeno humano. Éxons da codificação (E) são indicados com caixas.

Cai et al.²⁴ (B) também contribuíram para os esclarecimentos acerca dos polimorfismos. Resultados desse estudo, que examinou a associação entre PvuII e XbaI e o risco de câncer de mama, contaram com a participação de 1.459 mulheres com o agravo e 1.556 controles. Após análises comparativas, verificaram que os polimorfismos PvuII-TT e XbaI-AA estavam associados ao câncer, com OR de 1,4 e 1,3, respectivamente. Da mesma forma, Shin et al.³³ (B) mostraram associação positiva entre o alelo A do RE α -351 com maior risco de câncer de mama, onde OR para mulheres com o genótipo AA foi de 2,38 comparado àquelas com genótipo GG do RE α -351, havendo efeito protetor em portadoras de pelo menos uma cópia do alelo G (OR=0,4). Neste mesmo estudo, quando os dados foram estratificados por fatores de risco conhecidos, nuliparidade ou primeira gravidez acima dos 30 anos de idade, o genótipo AA aumentou 4 vezes o risco (OR=4,0) quando comparado ao genótipo de mulheres contendo o alelo G e primeira gravidez antes dos 29 anos de idade. Wedrén et al.⁴⁰ (B) avaliaram polimorfismo do RE α no íntron 1 (PvuII e XbaI) e no éxon 4 (C975→G) e câncer de

mama, obtiveram resultados positivos somente na união desses polimorfismos em mulheres obesas com câncer ductal. Haplótipos XbaI e C975→G (OR=1,48), coincidindo com o resultado correspondente ao haplótipo PvuII e C975→G; (OR=1,59).

Estudando a influência do RE α e terapia hormonal na densidade mamográfica (fator de risco independente para câncer de mama), van Duijnhoven et al.³⁰ (A) relataram a associação entre o aumento da densidade mamária e presença do genótipo RE α -397 (OR=2,24), em mulheres usuárias de terapia hormonal. Nesse mesmo sentido, Ramos et al.³⁵ (B), investigando a distribuição genotípica do polimorfismo XbaI em mulheres com mamas densas, verificaram que mulheres com dois alelos mutados (homozigoto mutado) apresentavam cerca de 2,5 vezes mais chances de terem mamas densas, quando comparadas àquelas com um ou dois alelos normais para esse polimorfismo (OR=2,34). Crandall et al.²⁹ (A) também associaram densidade mamográfica positivamente à polimorfismos no gene RE α .

González-Mancha et al.²⁷ (B) analisaram a presença da variante PvuII em 444 mulheres com câncer de mama e 704

Tabela 1 - Estudos de associação dos polimorfismo Er α -PvuII 397 T/C com câncer de mama e/ou com fatores de risco para a doença

Genótipo	Alelo	População	Tipo e tamanho do estudo	Associação	OR/RR	Referência
RE α – PvuII 397 T/C	TT	Americana pré e pós-menopausa	Somente Casos/Caso-controle 257/140	Diagnóstico em mulheres mais jovens		Yaich et al. ²³ (B)
	TT	Shangai, chinesa	Caso/controlado 1.069/1.166	↑ risco para câncer de mama	OR=1,4; IC95% 1,1–1,8 p=0,042	Cai et al. ²⁴ (B)
	TT	Holandesa, caucasiana	Caso/controlado 380/422	↑ risco para câncer de mama	RR=1,5 IC95% 0,94–2,42	Onland-Moret, van Gils e Roest ²⁵ (B)
	TT	Chinesa 2 a 55 anos	Caso/controlado 259/278	↑ risco de câncer de mama em mulheres com história familiar positiva	OR=3,04; IC95% 0,73–12,67	Shen et al. ²⁶ (B)
	TT	Espanhola 26 a 86 anos	Caso/controlado 444/704	↑ de risco de câncer de mama em mulheres com história familiar positiva	OR=3,81; IC95% 1,25–11,6	Gonzalez-Mancha et al. ²⁷ (B)
	TT	Holandesa 55 anos ou mais	Caso/controlado 190/3.513	↑ de risco de câncer de mama em mulheres após a menopausa	OR=1,4; IC95% 0,8–2,2	González-Zuloeta Ladd et al. ²⁸ (B)
	TT	Americanas, perimenopausa 42 a 52 anos	Cohort longitudinal 451	↑ Maior densidade mamográfica em mulheres brancas	7,0%; p=0,01	Crandall et al. ²⁹ (A)
	TT/TC	Holandesa e inglesa, após menopausa	Populacional Cohort prospectivo Caso/controlado (795 com TH/781 sem TH)	↑ Maior densidade mamográfica somente em usuárias de TRH	2,24% p<0,01	van Duijnhoven et al. ³⁰ (A)
	TC	Holandesa	Caso/controlado 380/422	↑ risco para câncer de mama	OR=1,14; IC95% 1,00–1,32	Onland-Moret, van Gils e Roest ²⁵ (B)
	TC	Chinesa 25 a 55 anos	Caso/controlado 259/278	↑ risco para câncer de mama (com história familiar)	OR=2,46; IC95% 0,61–9,88	Shen et al. ²⁶ (B)
	CC	Shangai, chinesa 22 a 64 anos	Populacional Cohort prospectivo 1.459 casos	Expressão RE negativa; pior prognóstico para câncer de mama	OR=3,30; IC95% 1,42–7,69	Boyapatti et al. ³¹ (B)
	CC	Holandesa e inglesa, pós-menopausa	Populacional Cohort prospectivo caso/controlado (795/781)	Densidade mamográfica sem alterações em usuária de TH	0,90% p=0,47	van Duijnhoven et al. ³⁰ (A)

OR: Odds Ratio; RR: risco relativo; TH: terapia hormonal; TRH: terapia de reposição hormonal; RE: receptor de estrógeno; IC95%: intervalo de confiança de 95%

controles; na genotipagem, encontraram significativa representação do alelo T entre os casos com antecedentes familiares de câncer, em comparação com os controles (0,53 e 0,65, respectivamente). Desta maneira, a atribuição do polimorfismo PvuII foi estatisticamente significativa entre casos de câncer familiar (OR=3,81). Por outro lado, Dunning et al.³⁸ (A), em revisão sistemática de estudos caso-controle notaram que não houve associação significativa entre SNP XbaI e PvuII e câncer de mama ($p=0,06$ e $p=0,36$ respectivamente), porém ressaltaram que a relação entre SNP de tais genes e risco de câncer de mama poderia ser diferente entre mulheres estratificadas

com base em seus níveis estrogênicos e idade, o que não foi considerado pelos autores.

Shen et al.²⁶ (B) demonstraram que pode existir combinação funcional dos alelos. Com o objetivo de avaliar se a suscetibilidade dos genótipos RE α XbaI, RE α PvuII, CYP1A1 MspI tinham efeitos somatórios para o risco de câncer de mama, os autores estudaram conjuntamente esses três haplótipos. Seus resultados mostraram que a combinação das variantes alélicas dos três locos aumentou o risco de câncer de mama ainda mais (OR=8,07).

Ladd et al.²⁸ (B) analisaram 3.893 mulheres após a menopausa, registrando aumento não significativo de câncer de mama apenas

Tabela 2 - Estudos de associação do polimorfismo ER α -351 XbaI A/G com câncer de mama e/ou com fatores de risco a doença

Genótipo	Alelo	População	Tipo e tamanho do estudo	Associação	OR/RR	Referência
RE α 351 XbaI A/G	AA	Norueguesa 27 a 94 anos	Caso/controlado 360/672	↑ risco para câncer de mama após menopausa	OR=2,02; IC95% 0,96–4,31	Andersen et al. ³² (B)
	AA	Coreana	Caso/controlado 205/205	↑ risco para câncer de mama	OR=2,38; IC95% 1,58–3,58	Shin et al. ³³ (B)
	AA	Coreana	Caso/controlado 205/205	↑ risco para câncer de mama em nulíparas	RR= 4,0; IC95% 1,9–8,8	Shin et al. ³³ (B)
	AA	Holandesa e inglesa, pós-menopausa	Cohort, prospectivo 791 com TH/ 781 sem TH	↑ densidade mamográfica em usuárias de TH	2,20% $p<0,01$	van Duijnhoven et al. ³⁰ (A)
	AA	Chinesa		↑ risco para câncer de mama	OR=6,88; IC95% 0,80–59,15 $p=0,079$	Hu et al. ³⁴ (B)
	AA	Chinesa 25 a 55 anos	Caso/controlado	↑ risco para câncer de mama; com história familiar positiva	OR=4,20; IC95% 0,65–27,28	Shen et al. ²⁶ (B)
	AA	Holandesa, 55 anos ou mais	Caso/controlado 190/3.513	↑ risco para câncer de mama em mulheres após menopausa	OR=1,3; IC95% 0,7–2,2	González-Zuloeta Ladd et al. ²⁸ (B)
	AA	Brasileira pós-menopausa	Prospectivo 120	↑ maior densidade mamária	OR=2,34; IC95% 1,06–5,16 $p=0,03$	Ramos et al. ³⁵ (B)
		Canadense pré-menopausa Idade média de 48 anos	Populacional observacional 741	Não significativa associação com a densidade mamográfica	$p>0,05$	Dumas e Diorio ³⁶ (B)
		Inglesa	Revisão sistemática de estudos caso controle	Diferença não significativa	$p=0,06$	Dunning et al. ³⁸ (B)
Haplótipo CC XbaI- C975→G	AA	Paquistanesa 15 a 65 anos	Caso/controlado 100/100	↑ de risco de câncer de mama após a menopausa	AA 45% maior que GG $p<0,01$	Javed et al. ³⁹ (B)
		Suecas, pós-menopausa	Caso/controlado 1.556/1.512	↑ de risco de Câncer de mama em mulheres após a menopausa e obesas	OR=1,48; IC95% 1,17–1,88	Wedrén et al. ⁴⁰ (B)
	AG	Norueguesa 27 a 94 anos	Caso/controlado 360/672	↑ risco para câncer de mama	OR=2,00; IC95% 0,92–4,37	Andersen et al. ³² (B)
	GG	Americana, caucasiana maior que 65 anos	Caso/controlado 393/790	↓ risco para câncer de mama	OR=0,82; IC95% 0,68–1,00 $p=0,04$	Wang et al. ⁴¹ (B)
	GG	Holandesa e inglesa, pós-menopausa	Cohort prospectivo 795 com TH 781 sem TH	Densidade mamográfica sem alterações em usuária de TRH	0,65% $p=0,70$	van Duijnhoven et al. ³⁰ (A)
	A	Chinesa	Caso/controlado 114/121	↑ risco para câncer de mama	OR=1,4; IC95% 1,0–1,9	Hu et al. ³⁴ (B)
	G	Coreana	Caso/controlado 205/205	↓ risco para câncer de mama em mulheres pós-menopausas	RR=0,3; IC95% 0,1–0,5	Shin et al. ³³ (B)

OR: Odds Ratio; RR: risco relativo; TH: terapia hormonal; TRH: terapia de reposição hormonal; RE: receptor de estrógeno; IC95%: intervalo de confiança de 95%

para PvuII (OR=1,2); ainda, justificaram este resultado pelo pequeno número de casos (190), o que conferiu poder baixo à pesquisa. Os autores avaliaram seus dados com aqueles da literatura, através de metanálise²⁸ (A) e não encontraram diferenças estatísticas entre os genótipos mutados e selvagens para ambos polimorfismos. Dumas e Diorio³⁶ (B) também não encontram diferenças significativas entre mulheres na pré-menopausa com polimorfismos do RE α (PvuII e XbaI) e densidade mamográfica ($p>0,05$). Porém, as mesmas autoras, em revisão sistemática³⁷ (A) no ano de 2011, avaliaram estas variantes alélicas e densidade mamográfica, demonstrando que quando as mulheres são estratificadas para alto nível de estrógeno, apresentavam associação positiva. Esta observação pode, de fato, apontar que existe diferença de fatores que influenciam a densidade mamográfica em mulheres na pré e pós-menopausa.

Javed et al.³⁹ (B) em estudo caso-controle em 2011, combinaram os efeitos da idade da menopausa, polimorfismos XbaI e PvuII e a ocorrência de câncer de mama na população paquis-

tanesa e concluíram que o genótipo XbaI foi 45% maior nos casos de câncer de mama.

Conclusões

As evidências mostram que fatores hormonais, em conjunto com fatores genéticos, podem aumentar a suscetibilidade individual para o câncer de mama. No entanto, é interessante observar que após estratificação para fatores já conhecidos, que levam à alta exposição ao estrógeno durante a vida (menarca precoce, nuliparidade, primeira gravidez após os 28 anos e menopausa tardia), observa-se aumento de risco principalmente em mulheres após a menopausa. Maior número de publicações se faz necessário para gerar conhecimento sobre a frequência de polimorfismos regional. Programas populacionais com identificação do perfil genético de risco para o câncer de mama poderão fornecer dados para evitar-se exposição a estrógenos exógenos.

Leituras suplementares

1. WHO, 2012 [cited 2012 Mar]. Available from: <http://www.who.int/cancer/nccp/en/>
2. Instituto Nacional do Câncer (INCA). [cited 2012] Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>
3. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BAJ, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8(10):843-54.
4. Lizard-Nacol S, Coudert B, Colosetti P, Riedinger JM, Fargeot P, Brunet-Lecomte P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res*. 1999;1(1):81-7.
5. Peto J, Easton DF, Matthews FE, Ford D, Swerdlow AJ. Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS study. Office of Population Censuses and Surveys. *Int J Cancer*. 1996;65(3):273-83.
6. Wu PE, Shen CY. 'Hide-then-hit' to explain the importance of genotypic polymorphism of DNA repair gene in determining susceptibility to cancer. *J Mol Cell Biol*. 2011;3(1):59-65.
7. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genômica e genética do câncer. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson – Genética Médica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008. p. 390.
8. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991;64(2):235-48.
9. Pharoah PDP, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358(26):2796-803.
10. Garcia-Closas M, Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24): 8000-9.
11. MadaK-Erdogan Z, Kieser JK, Kim SH, Komm B, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen S. Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. 2008;22(9):2116-27.
12. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Willet WC, Speizer FE, Kelsey KT, Hunter DJ. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res*. 1999;59(5):1015-20.
13. Allred DC, Brown P, Medina D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004; 6(6):240-5.
14. Zuppan P, Hall JM, Ponglikitmongkol M, King MC. Possible linkage of the estrogen receptor gene to breast cancer in a family with late-onset disease. *Am J Hum Genet*. 1991;48(6):1065-8.
15. Ding SL, Yu JC, Chen ST, Hsu HM, Ho JY, et al. Diverse associations between ESR α polymorphism and breast cancer development and progression. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3473-84.
16. Stacey SN, Sulem P, Zanon C, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Helgason A, et al. Ancestry-Shift Refinement Mapping of the C6orf97-ESR1 Breast Cancer Susceptibility Locus. *PLoS Genet*. 2010;6(7):e1001029.
17. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, et al. Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*. 2005;161(4):307-20.
18. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999;140(12):5566-78.
19. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 2007;447(7148):1087-93.
20. Massart F, Reginster JY, Brandi ML. Genetics of menopause-associated diseases. *Maturitas*. 2001;40(2):103-16.
21. Brandi ML, Bercherini L, Gennari L, Racchi M, Bianchetti A, Nacmias B, et al. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265(2):335-8.
22. Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R. Polymorphisms of estrogen receptor alpha in prostate cancer. *Mol Carcinog*. 2003;37(4):202-8.
23. Yach L, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF. Analysis of the 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.
24. Cai Q, Gao YT, Wen W, Shu XO, Jin F, Smith J, et al. Association of Breast Cancer Risk with a GT Dinucleotide Repeat Polymorphism upstream of the Estrogen Receptor- α Gene. *Cancer Res*. 2003;63(18):5727-30.
25. Onland – Moret NC, van Gils CH, Roest M. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control*. 2005;16(10):1195-202.
26. Shen Y, Li DK, Wu J, Zhang Z, Gao E. Joint effects of the Cyp1A1 MspI, ER α PvuII, and ER α XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(2):342-47.
27. González-Mancha R, Galán JJ, Crespo C, Iglesias Pérez LI, González-Pérez A, et al. Analysis of the ERalpha germline PvuII marker in breast cancer risk. *Med Sci Monit*. 2008;14(3):CR136-43.
28. González-Zuloeta Ladd AM, Vásquez AA, Rivadeneira F, Siemes C, Hofman A, Stricker BH, et al. Estrogen receptor α polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107(3):415-9.

29. Crandall CJ, Sehl ME, Crawford SL, Gold EB, Habel LA, Butler LM, et al. Sex steroid metabolism polymorphisms and mammographic density in pre – and early perimenopausal women. *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R51.
30. van Duijnhoven FJ, Peeters PH, Warren RM, Bingham SA, Uitterlinden AG, van Noord PAH, et al. Influence of estrogen receptor alpha and progesterone receptor polymorphisms on the effects of hormone therapy on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(3):462-7.
31. Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Smith JR, Wen W, et al. Polymorphisms in ER α gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1093-8.
32. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Børresen AL. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Gen.* 1994;94(6):665-70.
33. Shin A, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park KS, Kim SU, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;80(1):127-31.
34. Hu Z, Song CG, Lu JS, Luo JM, Shen ZZ, Huang W, et al. A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(12):969-78.
35. Ramos EHM, Martinelli S, Silva I, Nazário A, Facina G, Costa A, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric.* 2009;12(6):490-501.
36. Dumas I, Diorio C. Polymorphisms in genes involved in the estrogen pathway and mammographic density. *BMC Cancer.* 2010;10:636.
37. Dumas I, Diorio C. Estrogen pathway polymorphisms and mammographic density. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4369-86.
38. Dunning AM, Healey CS, Baynes C, Maia, AT, Scollen S, Vega A, et al. Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2009;18(6):1131-9.
39. Javed S, Ali M, Sadia S, Aslam MA, Masood AI, Shaikh RS, et al. Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. *Maturitas.* 2011;69(4):377-82.
40. Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvänen AC, et al. Oestrogen receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res.* 2004;6(4):R437-49.
41. Wang J, Higuchi R, Modugno F, Li J, Umblas N, Lee J, et al. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106(2):273-80.
42. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 2000; 65:227-251.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

ISSN: 1948-5956

Journal of Cancer Science & Therapy

**The International Open Access
Journal of Cancer Science & Therapy**

Editor-in-Chief

Sudhakar Akul Yakkanti, PhD

Associate Director: Center for Cancer and Metabolism
Stanford Research Institute (SRI) International, Menlo Park,
CA USA

Associate Editor-in-Chief

Sridhar Mani, MD

Albert Einstein College of Medicine, USA

Senior Executive Editor

Jimmy Thomas Efird, PhD

East Carolina University, USA

Executive Editors

William E Grizzle, MD, PhD

University of Alabama, USA

Peter E Barker, PhD

National Institute of Standards and Technology, USA

Available online at: OMICS Publishing Group (www.omicsonline.org)

This article was originally published in a journal by OMICS Publishing Group, and the attached copy is provided by OMICS Publishing Group for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for commercial/research/educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are requested to cite properly.

Research Article

Open Access

Clinical Factors Associated with High Mammographic Density in Postmenopausal Women and their Relationship with Dinucleotide *Gtn* Repeat Polymorphism in the Estrogen Receptor Alpha Gene

Marilene Alicia Souza^{1*}, Angela Maggio da Fonseca¹, Vicente Renato Bagnoli¹, Nestor de Barros¹, Victor Hugo Souza Hortense², Kátia C Carvalho³, José Maria Soares-Jr¹ and Edmund C Baracat¹

¹Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Brazil

²Pontifícia Universidade Católica – Curitiba (PR), Brazil

³Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM-58), Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Abstract

Introduction: Epidemiological evidence shows that variations in estrogen receptor (ER) genes cause alterations in the effect of estrogen in breast tissue, which may explain individual variations in mammographic density. High mammographic density (HMD) is an important risk factor for breast cancer.

Objective: To evaluate the association of clinical features and polymorphism of *ERα-(GT)n* gene and mammographic density in post-menopause women.

Casuistry and method: According to ACR-BIRADS criteria, 463 post-menopause women of ages between 45 and 60 have been prospectively analyzed through computer objective assessment, being 308 with HMD and 155 with non-dense breasts (Control group). The participants had not used hormone therapies 12 months prior to assessments and had no personal history of breast cancer. Risk factors for breast cancer considered by other studies also have been analyzed in this paper. Peripheral blood samples have been obtained to extract DNA and to analyze the presence of polymorphism in the *ERα-(GT)n* promoter region.

Results: From the risk factors considered for breast cancer, there was association with high mammographic density in: age ($p=0.005$); waist circumference ($p=0.001$); number of pregnancies ($p=0.007$); age at 1st birth ($p=0.035$); family history ($p=0.035$); time after menopause ($p=0.007$), and body mass index ($p=0.022$). Differences between HMD and controls for distribution of *tanden* repeats polymorphism genotype STRs-*(GT)n* ($p=0.151$) was verified as non-significant.

Conclusion: Our data showed that age, waist circumference, number of pregnancies, age at 1st birth, family history of breast cancer, time after menopause, and body mass index were associated to post-menopause HMD. However, *tanden* repeats polymorphism (*GT)n* may not be associated with HMD but it will be necessary studies with a larger number of cases as we have obtained few genotypes (*GT)n* higher than 17 repeats.

Keywords: Estrogen receptor; Breast cancer; Mammographic; Polymorphisms

Introduction

Breast cancer is the most common form of cancer among women, comprising approximately 23% of all tumors in women [1]. Although mortality has been decreasing in some countries, breast cancer is still the most frequent cause of death among women between ages 35 and 55. The broad understanding of risk factors for breast cancer results in better insight of biomolecular processes leading to the disease, allowing for health professionals to offer information, counseling, and objective answers to emerging patient questions. In terms of public health, the recognition of risk factors for a pathology and its adequate management towards tracing, treatment, and prevention are of essential importance in order to lower its incidence and, therefore, its prevalence. The study of polymorphisms related to the disease are tools that may have direct implications of great importance in the individual susceptibility to breast cancer on the study of response to several drugs, as well as prognostics. This study was motivated by a study of polymorphisms in lowly-penetrant genes previously associated to increased breast cancer risk and high mammographic density in post-menopause women.

Sexual steroids, the main regulators of breast lobule kinetics, are known to be liposoluble, penetrating passively into the cytoplasm and interacting with its receptors present in the nucleus of target cells,

where they regulate genetic expression [2]. Estrogen Receptor (ER) is members of the super-family of nuclear receptors controlling genetic transcription. The α and β isoforms of ER are the main presenters of distribution and genetic expression patterns which are distinct in different tissue types.

ERα expression has been broadly studied in breast tumors due to its being an important measurement of humoral response, as well as for being involved in several estrogen actions onto target cells, directly inducing genes associated with the control of cell proliferation and apoptosis such as cyclin D1, TGF α , IGF1, and progesterone receptors

***Corresponding author:** Marilene A Souza, Rua Azarias Leite, 12-22, Bauru, SP, CEP 17010250, Brazil, Tel: 551432236538, Fax: 551432236538; E-mail: marilenealicia@hotmail.com

Received February 23, 2014; Accepted March 27, 2014; Published April 01, 2014

Citation: Souza MA, da Fonseca AM, Bagnoli VR, de Barros N, Souza Hortense VH, et al. (2014) Clinical Factors Associated with High Mammographic Density in Postmenopausal Women and their Relationship with Dinucleotide *Gtn* Repeat Polymorphism in the Estrogen Receptor Alpha Gene. J Cancer Sci Ther 6: 142-147. doi:10.4172/1948-5956.1000262

Copyright: © 2014 Souza MA, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

[3,4]. Therefore, ER are seen as prognostic factors for breast cancer and also predictors of hormonal therapy response with up to 70% for women with ER positive (ER+) tumors [5].

For the present study, the Sequential Tandem Repeats polymorphism of the ERα STRs-(*GT*)*n* gene has been chosen due to its association to increased death risk by breast cancer [6] (Figure 1). The ERα gene is located at chromosome 6 (6q25.1), being composed of 8 exons and over 140 kb [7].

Source: Modified of the Genari et al., 2004 [8]

Methods

The case-control study included 308 women with HMD (more than 50% mammographic density) and 155 control participants (50% density or less), aged 45-65, without menstrual periods or hormone therapy for at least 1 year, and without previous breast or ovarian cancer occurrences. Patients were initially selected subjectively through ACR-BIRADS® [9] standard, by a single reader (head of the Institute of Radiology, Hospital das Clinicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), São Paulo, Brazil), from January 2010 to March 2013. Selected patients were evaluated a second time through computer objective method by another reader, as described by Boyd et al. [10]. The study was approved by the Ethics Committee for Analysis of Research Projects - CAPPesq at the HC-FMUSP, and all women have signed an informed consent form. Clinical history and physical examination has characterized: age at menarche and menopause, parity, age at first childbirth, family history of breast cancer (FHBC), smoking, alcohol intake, and body mass index (BMI). Peripheral blood samples were obtained for genomic DNA extraction and determination of polymorphisms.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), following manufacturer instructions. After DNA quality and integrity evaluation, tandem repeats polymorphism (*GT*)*n* has been confirmed by direct

sequencing through automatic DNA sequence device ABI PRISM 3700 (Life Technologies) as described by Cai et al. [11]. The laboratory was blind on subject identification.

Statistical analyses: Data was described using average, standard deviation (sd), absolute frequency (n), and relative frequency (%). In order to verify the association between qualitative variables with mammographic density, the chi-square test (X^2) was used. For comparison between the HMD and Control groups, the Kolmogorov-Smirnov Test was used as quantitative variable in order to verify data normality. Since there is no normal distribution in all groups, the nonparametric Mann-Whitney Test was used for comparison between groups. In order to verify the relation between the studied variables and the occurrence of high mammographic density, the Multivariate Logistic Regression model was used stepwise backward. The variables entered in the model were those presenting values $p < 0.20$ in the bivariate analyses. A significance level of 5% ($p < 0.05$) was adopted in all statistical tests.

Results

Distributions of selected demographic characteristics that are the main risk factors for breast cancer are presented in Table 1. Elevated risk of High Mammographic Density was observed for similar main risk factors to those reported in previous studies [12,13].

Significant differences have been observed between the HMD and Control groups in relation to Age ($p = 0.001$); waist circumference ($p < 0.001$); number of pregnancies ($p < 0.001$); Age at first birth ($p < 0.001$); Time after menopause ($p = 0.007$); and BMI ($p < 0.022$).

Regarding age, $OR = 0.93$ e $IC95\% = 0.88-0.99$; $p = 0.005$. It is observable that for each year added to age, the probability of being classified as dense mammography diminishes in 6.8%. We have verified that greater abdominal circumference has acted as a protective factor for the occurrence of dense mammography, with values of $OR = 0.96$ e $IC95\% = 0.94-0.98$; $p = 0.001$. Each unit added to abdominal

Figure 1: Structure of functional domains of and described polymorphisms in the human estrogen receptor α gene. Coding exons (E) are indicated with boxes. Estrogen receptor α divided into 6 functional regions (A-F). TAF, transcriptional activating function. Source: Modified of the Genari et al. [9].

		Control		HMD			
Quantitative variables		Average	Sd	Average	Sd	Z	P
Age		58.16	4.61	56.31	5.42	3.40	0.001*
Waist circumference		95.06	11.13	89.47	10.83	5.04	<0.001*
Number of Pregnancies		3.63	2.56	2.46	1.83	4.62	<0.001*
Number of births		2.84	1.98	1.99	1.54	4.37	<0.001*
Number of Abortions		0.79	1.20	0.48	0.87	2.93	0.003*
Menopause		46.83	6.26	46.45	6.33	0.49	0.621
Age at first birth		21.88	5.16	24.04	6.04	3.61	<0.001*
Menarche		12.87	1.78	13.17	1.78	1.66	0.096
Time after menopause		11.33	6.42	9.85	7.38	2.69	0.007*
Qualitative variables		n	%	n	%	χ^2	P
BMI	Normal / overweight	81	52.3	195	63.3	5.23	0.022*
	Obese	74	47.7	113	36.7		
Smoking	No	140	90.3	264	85.7	1.97	0.161
	Yes	15	9.7	44	14.3		
Alcohol intake	No	137	88.4	258	83.8	1.76	0.185
	Yes	18	11.6	50	16.2		
Metabolic Syndrome	No	104	67.1	220	71.4	0.92	0.337
	Yes	51	32.9	88	28.6		

Quantitative variables*: statistically significant difference (p<0.05)

Nonparametric Mann-Whitney test

*Qualitative variables: statistically significant difference (p<0.05)

Chi-square test

Table 1: Comparison between the two groups of Mammographic Density: High Mammographic Density (HMD) and Control in quantitative and qualitative variables.

circumference lowers risk in 4.4%. Significant differences between the groups have been observed in relation to the number of pregnancies, with OR=0.83 e IC95%=0.72-0.95; p=0.007. Each pregnancy added lowers risk of dense mammography in 17%. The age upon having a first child has influenced positively on the occurrence of dense mammography. OR=1.05 e IC95%=1.004-1.106; p=0.035. For dense mammography, age average of 24.04 years was verified and, for non-dense mammography, 21.88 years of age, in average. Each year in delaying the first full pregnancy increases risk in 5.3%.

Values obtained in associating mammographic density and FHBC has shown the chance of having dense mammography being 2.02 times greater for people with such risk factor. OR=2.028 e IC95%=1.052-3.909; p=0.035.

Time since their menopause has influenced the patterns of mammographic density. The longer since the menopause, the greater chance they were classified as non-dense mammography. When correlating BMI and mammographic density patterns, an inverse association has been observed between obesity and high-density mammography.

Tanden repeats polymorphism (GT)*n*

Distribution of repeats polymorphism (GT)*n* between HMD and control groups can be seen in Table 2. Samples have been divided based on an average of 15 repetitions.

There was no significant difference between repeats polymorphism (GT)*n* and mammographic density patterns; however, we have observed that the greater the number of repetitions, the greater chance of having dense mammography (OR=1.34).

From the clinical features analyzed, only those presenting bivariate analyses values p<0.20 have been used in the model. Results presented are derived from a *stepwise backward* Multivariate Logistic Regression model (Table 3).

Considering variables which present association with HMD:

(age, time after menopause, waist circumference, BMI, number of pregnancies, age at 1st birth, and FHBC), after multivariate logistic regression only age, waist circumference, number of pregnancies, age at 1st birth, and FHBC have been considered to be independent risk factors (Table 3).

Discussion

There is currently strong evidence that HMD is an independent risk factor for breast cancer [10]. It presents elevated risk (4-6 relative risk), being comparable to other risk factors such as: atypical epithelial hyperplasia, as well as mother and sister with breast cancer and proven genetic susceptibility – beating factors such as nulliparity, history of non-atypical hyperplasia, late menopause, and early menarche [14].

It is believed that mammographic patterns are multi-factorial and influenced by age, reproductive factors, age of menarche, menopausal status, family history, eating habits, sedentary lifestyle, hormone therapy, and excessive alcohol intake. However, such factors explain only 20-30% of mammographic density variation [15]. Studies in monozygotic twins have shown hereditary factors results in 60% of mammographic density [16]. Among potential genetic influences, it is observable that the combination of proliferating effects on (mitogenic) cells and (mutagenic) genetic damage may base the increased risk for breast cancer and HMD [14]. There is clear necessity in improving the understanding of specific factors involved in this process, and in the role of growth factors, as well as of hormonal intervention in the various components of breast tissue. It is particularly probable that gene identification, responsible for variations in percentages among the various tissues in the breast (and their biological functions), may shed light upon the biology of breasts while identifying potential markers for breast cancer prevention.

Clinical factors associated to breast cancer and high mammographic density

Age is still the main risk factor for breast cancer; occurrence rates

Dense Mammography	GT(n)		Total
	≤15	>15	
No	74	70	144
	51.4%	48.6%	100.0%
Yes	136	172	308
	44.2%	55.8%	100.0%
Total	210	242	452
	46.5%	53.5%	100.0%

$\chi^2 = 2.06$; $p = 0.151$; $OR = 1.34$; $IC95\% = 0.90 - 1.99$

Table 2: Association between type of mammography and repeats polymorphisms (GT)n.

Independent Variables	B	Standard Deviation B	OR	OR (IC95%)	p
Constant	7.330	1.715			
Age	-0.070	0.025	0.932	0.888 0.979	0.005
Waist Circumference	-0.038	0.011	0.963	0.943 0.984	0.001
Number of Pregnancies	-0.186	0.069	0.830	0.725 0.950	0.007
Age at 1st birth	0.052	0.025	1.053	1.004 1.106	0.035
Family History	0.707	0.335	2.028	1.052 3.909	0.035

Table 3: Multivariate Logistic Regression using *stepwise backward* method, with dependent variable HMD and independent variables: Age, Menopause, Time after menopause, Ethnicity, Waist Circumference, BMI, Number of Pregnancies, Number of Birth, Number of Abortions, Age at 1st childbirth, Menarche, Smoking, Alcohol Intake, Family History.

increase rapidly up to age 50, increasing more slowly later. The opposite happens with mammographic density, which decreases with age. In young people, usually breasts are dense and progressively devolve with age. In our study, the sample comprised post-menopause women aged between 45 and 65. It is observable that for each year added to age, the probability of being classified as highly dense mammography diminishes in 6.8%. The group of HMD presented an age average of 56.31 and standard deviation of 5.42 while the Control group aged 58.16 $\pm$ 4.61. This relation was statistically significant ($p < 0.001$), showing that the younger women are, the more likely they are to have HMD (for more than 50% of fibroglandular tissue). These findings are in agreement with the specialized literature, pointing towards a decrease in mammographic density upon aging [17,18].

With reduced rates of estrogen and progesterone after menopause, the cell proliferation cycle process acquiesces and the mammographic imaging quickly becomes radiolucent. Every 2 years in menopause diminishes mammography density in 9% [19]. In the present study, women have presented relatively precocious menopause, at an age average of 46.45 (sd 6.33) for the HMD group, and 46.83 (dp 6.26) for the Control group ($p = 0.540$), not characterizing a risk factor for HMD. Such data also coincides with records by Matos et al. [20], who have also not found menopause age to be a risk factor for breast cancer (age average of 47). However, when mammography density is associated with time after menopause, we have verified on our data. Therefore, for every 2 additional years of menopause, there was a 25% lower risk in presenting HMD.

Menarche age is associated both to ovarian hormone exposition and to teenage nutritional factors. Women with menarche before age 12 have a 20% greater risk of developing breast cancer throughout their lifetime, in comparison to those whose menarche was after age 14. Late menarche (≥ 15 years old) lowers neoplasm risk in 28% when compared to those whose menarche was before age 12 [21]. However, other studies have not found any association between mammographic density and age of menarche, suggesting that the mechanism through

which early menarche increases breast cancer risk is not through mammographic density [22,23]. In our study, we have verified that this factor has not influenced mammographic density ($p = 0.096$), which coincides with previous studies performed on Brazilian populations [12,24,25].

During full pregnancy and breastfeeding, the breast reaches full development due to an initial growth phase followed by lobular differentiation marked by the shift from a type-1 breast to types 3 or 4, which results in the protection of the organ from carcinogenic factors. Such physiological and hormonal changes in breast tissue are a result of complex interactions between hormones and growth factors. The increase of dense mammography is associated with nulliparity and old age at having the first birth. Each birth reduces risk of breast cancer (ER+ and PR+) by 11%, and women with late 1st childbirth (≥ 35 years old) had 27% greater risk in developing breast cancer, in comparison with women whose first child was born before they reached age 20 [26]. MacMahon was the first to show the protective effects of women's age at first childbirth against breast cancer, concluding that mothers before age 20 had 50% reduction in the risk of developing breast cancer [27]. The protective effect of early age upon women's first childbirth was equally observed in our data ($p < 0.001$). Among the 308 women with HMD, the age average upon their first childbirth was of 24.04 years; 19.58% women had their first child after age 28, 13.31% [28] after age 30, and 22.08% had no children. The average age was of 21.88 years old (sd=5.16) for women with liposubstituted breasts, and every year late in having their first child has increased risk in 5.3%. Meta-analysis of 9 cohort or case-control studies have also revealed risk reduction of ER+ breast cancer among women with first full pregnancy before age 20. Such protective factor against breast cancer has been observed particularly on post-menopause women [29]. Morphological and functional alterations in breast tissue related to childbirth have been studied extensively [30]. With successive pregnancies, epithelial cells become more differentiated and less proliferative, which contributes with lower mammographic density. Our data reveals statistically significant association between childbirth and mammographic density ($p = 0.001$). The group of women with dense mammography had a parity average of 2.46 children, and women with liposubstituted breasts had an average of 3.63. Each extra child reduces risk of dense mammography in 17%, coinciding with data found by Lope et al. [31], which had detected 16% risk reduction per childbirth. The mechanisms through which these protective effects are mediated are unknown; however, early and complete maturation of the breast glands has been suggested as a protective factor against breast cancer [32]. Therefore, as the population ages, low fertility rates and delay in first childbirth favor an environment with increased risk for breast cancer.

As for ethnicity, breast cancer mortality varies considerably amongst different ethnic groups [33]. In the United States; there is greater occurrence among Caucasian and African-American women; intermediate occurrence among Hispanic and Native Americans; and smaller occurrence among Asians [1]. In Brazil, its miscegenated population influences on disease incidence [34]; however, several researchers have found greater breast cancer prevalence on Caucasian women (34). On the studied group, the greatest representation in HMD were Caucasians (58.44%) followed by Mulatto (21.75%); however, the difference presented no significance.

Mammographic density is a highly hereditary risk factor for breast cancer [35]. Women with first-degree relatives diagnosed with breast cancer are, in average, more likely to have high mammographic density

than women of the same age with no family history. Additionally, the average of dense mammography increases with the number of first-degree relatives with diagnosed breast cancer [36]. In Brazil, a review of literature performed by Pinho and Coutinho [24] has presented FHBC prevalence in first-degree relatives of 4% among the Brazilian female population. Our results have pointed towards 19.2% patients with HMD having mentioned breast cancer history in first-degree relatives ($p=0.035$). Chances of having HMD are 2.028 times greater for women with breast cancer family history, which shows greater prevalence of this risk factor in the population and suggests greater genetic influence of breast cancer, in accordance with data from the specialized literature.

High alcohol intake has been associated with increased mammographic density by Vanchon et al. [37]; Herrinton et al. [38]; and Matos et al. [20] studying prevalence of risk factors in women with breast cancer, which have observed that 13% were smokers and 21.2% drank occasionally. However, collaboration between 53 epidemiological studies has shown that smoking has little to no effect in the risk of developing breast cancer. Meta-analysis of data from 40 studies has estimated non-alcoholic women having 10% greater risk of breast cancer, when compared to women taking one daily dose (12 g) of alcohol (Ellison et al.) [39]. Our data has not presented significant association between HMD and smoking or drinking habits, with p values of 0.161 e 0.185, respectively.

Obesity is a known risk factor for breast cancer in post-menopause women, especially when the relation between BMI is examined in association with mammographic density and breast cancer [28,40]. Women with high BMI have presented lower probability in having dense mammography; however, the risk of developing breast cancer for women weighing more than 81Kg was of $OR=1.7$ when compared to those weighing less than 63 Kg. However, the OR increased to 2.1 after adjustments for HMD. Such increase indicates that density is an independent risk factor, and that obese women with HMD have increased risk of developing breast cancer. It is suggested still that the risk of developing breast cancer increases in 8% for every additional 5.00 Kg gained during adult life [28]. Our data points toward high prevalence of obesity (40.4%); however, women with liposubstituted breasts were predominant (47.7%). The greater the amount of body fat, the lower the mammographic density. Obese women comprised 36.7% of the HMD group, being a significant difference ($p=0.022$). The same has occurred for waist circumference measurements: the greater the circumference, the greater chance of being qualified as liposubstituted breasts. Therefore, for each unit added in waist circumference the risk lowers 4.7%. Such data is in accordance with the literature [10,31,41].

Mammographic density and polymorphism of the estrogen receptor gene

Estrogen receptors play a critical role in developing normal breast tissue, and are also involved in the pathogenesis of breast cancer. Actually, approximately 2/3 of breast cancers express the alpha estrogen receptor. Epidemiological evidence also correlates steroid hormones to chances in mammographic density, analyzing whether variations in biosynthesis-regulating genes and hormonal metabolism could explain individual differences in mammographic density. The ER gene, located in the long arm of chromosome 6q25, has been associated to mammographic density in several studies [42] due to its importance in breast cancer development, progression, and prognostics.

There are several known polymorphisms in the ER α gene, among which are SNPs *PvuII* and *XbaI* and, more recently, the repetition

polymorphism (*GT*) n . Polymorphisms *PvuII* and *XbaI* are located at intron 1 of the ER α gene, with 50 base pairs between them [13]. Tandem repeats polymorphism (*GT*) n [STRs (*GT*) n] is located 6627 bp before the onset region of the transcription site of exon 1 to 144 kb of exon 2. Recent evidence has shown that polymorphisms in promoter regions of cell cycle regulating genes can influence significantly in regulating transcription [43]. The dinucleotide repeat *GT* of ER α gene is highly polymorphic, and the number of *GT* repeats interferes with gene transcription. When seeking the relationship between polymorphism with risk of breast cancer, Cai et al. [11] showed that the genotyping containing (*GT*) $_{17}$ or (*GT*) $_{18}$ was associated with decreased breast cancer risk ($OR=0.58$), mainly among post-menopause women with negative progesterone receptor and more than 30 years of menstrual cycles [11]. When studying the TA repeat polymorphism of the promoter region of the ER α gene and risk of osteoporosis, Genari et al. [8] concluded that the smallest number of repeats was associated with lower bone mineral density and increased risk of fracture.

A total of 11 genotypes were observed in our sample, which varied from *GT* $_{11}$ to *GT* $_{22}$. The most common repeats among women with HMD were (*GT*) $_{14}$, (*GT*) $_{15}$, (*GT*) $_{16}$ and (*GT*) $_{17}$, with 12.01%, 25.97%; 38.31%; and 8.44%, respectively; and among the Control group *GT* common repeats were (*GT*) $_{14}$, (*GT*) $_{15}$, (*GT*) $_{16}$ and (*GT*) $_{17}$, with 9.33%; 28.00%; 30.00%; and 8.66%, respectively. However, there was no significant difference between repetition polymorphism (*GT*) n and mammographic density patterns; however, we have observed that the greater the number of repetitions, the greater chance of having dense mammography ($OR=1.34$). Another group of researchers has found similar results, with greater frequency for genotype 16, also without statistical differences between the cases of breast cancer and control groups, with 41.5% and 37.6% respectively [11].

The molecular mechanisms through which these polymorphisms modify the receptor activity are not clear. Possible explanations include the existence of a functional combination between polymorphic alleles, in which both combining markers would alter genetic function as well as RNA stability [44]. Therefore, this study investigated whether the combination of repeat polymorphism (*GT*) n with *PvuII* and *XbaI* polymorphisms would modify dense mammography patterns. No interaction between them has been observed. Also observing whether polymorphisms *PvuII*, *XbaI*, and *GT* would modify survival of women with breast cancer, Boyapati et al. [7] have found that the genotype association has been modified by ER- or ER+ states. When comparing women with *pp* genotype, risk of death (RR) was of 3.30 and 0.54 for participants with, respectively, ER- and ER+. Similarly, women carrying repeat polymorphism *GT* $_{23}$ have been strongly related to RE-breast tumors (RR=1.48 for ER- and RR=0.25 for ER+).

Finally, from the variables presenting association with high mammographic density (age, waist circumference, number of pregnancies, age at 1st childbirth, time after menopause, family history, BMI, and *PvuII* genotype), only clinical factors age, abdominal circumference, number of pregnancies, age at 1st childbirth, and family history have proven to be independent factors for HMD multiple logistical regression ($p<0.05$). However, tandem repeats polymorphism (*GT*) n may not be associated with HMD but it will be necessary studies with a larger number of cases as we have obtained a few genotypes (*GT*) n higher than 17 repeats.

References

1. American Cancer Society (2013).

2. Key TJ (2011) Endogenous oestrogens and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 76: 812-815.
3. Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Barros N, Hortense VHS, et al. (2013) Polymorphisms in the Estrogen Receptor Alpha Gene and Mammographic Density Result Study in Brazilian Women. *J Cancer Sci Ther* 5: 446-451.
4. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 1474-1481.
5. Bland KI, Copeland EM (2010) The breast comprehensive management of benign and malignant diseases. 4th edition, Saunders Editor.
6. Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Smith JR, et al. (2005) Polymorphisms in ER-alpha gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clin Cancer Res* 11: 1093-1098.
7. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, et al. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231: 1150-1154.
8. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabrò A, Becherini L, et al. (2005) Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 161: 307-320.
9. ACR BI-RADS®. American College of Radiology (2003) Breast Imaging Reporting and Data System. Fourth ed. Reston VA.
10. Boyd NF (2013) Mammographic density and risk of breast cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*.
11. Cai Q1, Gao YT, Wen W, Shu XO, Jin F, et al. (2003) Association of breast cancer risk with a GT dinucleotide repeat polymorphism upstream of the estrogen receptor-alpha gene. *Cancer Res* 63: 5727-5730.
12. de Moura Ramos EH, Martinelli S, Silva I, Nazário A, Facina G, et al. (2009) Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric* 12: 490-501.
13. Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, de Barros N, Franzolin SO, et al. (2013) Polymorphisms of estrogen receptor-1 gene in Brazilian women with high breast density after menopause. *Gynecol Endocrinol* 29: 771-774.
14. Martin LJ, Boyd NF (2008) Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res* 10: 201.
15. Boyd NF, Martin LJ, Bronskill M, Yaffe MJ, Duric N, et al. (2010) Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 102: 1224-1237.
16. Martin KE, Helvie MA, Zhou C, Roubidoux MA, Bailey JE, et al. (2006) Mammographic density measured with quantitative computer-aided method: comparison with radiologists' estimates and BI-RADS categories. *Radiology* 240: 656-665.
17. Stomper PC, D'Souza DJ, DiNitto PA, Arredondo MA (1996) Analysis of parenchymal density on mammograms in 1353 women 25-79 years old. *AJR Am J Roentgenol* 167: 1261-1265.
18. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, et al. (2007) Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med* 356: 227-236.
19. Boyd NF, Greenberg C, Lockwood G, Little L, Martin L, et al. (1997) Effects at two years of a low-fat, high-carbohydrate diet on radiologic features of the breast: results from a randomized trial. Canadian Diet and Breast Cancer Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst* 89: 488-496.
20. Matos JC, Pelloso SM, Carvalho MDB (2010) Prevalência de fatores de risco para o câncer de mama no município de Maringá, Paraná. *Rev Latino-Am Enfermagem* 18: 57-64.
21. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG (1983) 'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature* 303: 767-770.
22. Jeon JH, Kang JH, Kim Y, Lee HY, Choi KS, et al. (2011) Reproductive and Hormonal Factors Associated with Fatty or Dense Breast Patterns among Korean Women. *Cancer Res Treat* 43: 42-48.
23. Butler LM, Gold EB, Greendale GA, Crandall CJ, Modugno F, et al. (2008) Menstrual and reproductive factors in relation to mammographic density: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Breast Cancer Res Treat* 112: 165-174.
24. Pinho VF, Coutinho ES (2007) [Variables associated with breast cancer in clients of primary healthcare units]. *Cad Saude Publica* 23: 1061-1069.
25. Lamas JM & Pereira MG (1999) Fatores de risco para o câncer de mama e para lesões pré-malignas em mulheres assintomáticas no Distrito Federal. *Rev Bras Mastol* 9: 108-114.
26. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G (2006) Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res* 8: R43.
27. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, et al. (1970) Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* 43: 209-221.
28. Lam PB, Vacek PM, Geller BM, Muss HB (2000) The association of increased weight, body mass index, and tissue density with the risk of breast carcinoma in Vermont. *Cancer* 89: 369-375.
29. Kobayashi S, Sugiura H, Ando Y, Shiraki N, Yanagi T, et al. (2012) Reproductive history and breast cancer risk. *Breast Cancer* 19: 302-308.
30. Russo J, Russo IH (2012) Molecular basis of pregnancy-induced breast cancer prevention. *Horm Mol Biol Clin Invest* 9: 3-10.
31. Lope V, Pérez-Gómez B, Sánchez-Contador C, Santamaría MC, Moreo P, et al. (2012) Obstetric history and mammographic density: a populacional-based cross-sectional study in Spain (DDM-Spain). *Breast Cancer Res Treat* 132: 1137-1146.
32. Toniolo P, Grankvist K, Wulff M, Chen T, Johansson R, et al. (2010) Human chorionic gonadotropin in pregnancy and maternal risk of breast cancer. *Cancer Res* 70: 6779-6786.
33. Ghafoor A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, et al. (2003) Trends in breast cancer by race and ethnicity. *CA Cancer J Clin* 53: 342-355.
34. Hallal PC, Dumith Sde C, Bastos JP, Reichert FF, Siqueira FV, et al. (2007) [Evolution of the epidemiological research on physical activity in Brazil: a systematic review]. *Rev Saude Publica* 41: 453-460.
35. Sclowitz ML, Menezes AM, Gigante DP, Tessaro S (2005) [Breast cancer's secondary prevention and associated factors]. *Rev Saude Publica* 39: 340-349.
36. Linton L, Martin LJ, Li Q, Huszti E, Minkin S, et al. (2013) Mammographic density and breast cancer: a comparison of related and unrelated controls in the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res* 15: R43.
37. Vachon CM, Sellers TA, Carlson EE, Cunningham JM, Hilker CA, et al. (2007) Strong evidence of a genetic determinant for mammographic density, a major risk factor for breast cancer. *Cancer Res* 67: 8412-8418.
38. Herrinton LJ, Saftlas AF, Stanford JL, Brinton LA, Wolfe JN (1993) Do alcohol intake and mammographic densities interact in regard to the risk of breast cancer? *Cancer* 71: 3029-3035.
39. Ellison RC, Zhang Y, McLennan CE, Rothman KJ (2001) Exploring the relation of alcohol consumption to risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 154: 740-747.
40. Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Baron JA, et al. (2000) Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes Control* 11: 533-542.
41. Alvares BR, Freitas CHA, Jales RM, Almeida OJ, Marussi EF (2012) Densidade mamográfica em mulheres menopausadas assintomáticas: correlação de dados clínicos e exames ultrassonográficos. *Rev Radiologia* 45: 149-154.
42. Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Soares-Jr JM, Barros N, et al. (2012) Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco do câncer de mama. *Femina* 40: 179-186.
43. Iwashita S, Koyama K, Nakamura Y (2001) VNTR sequence on human chromosome 11p15 that affects transcriptional activity. *J Hum Genet* 46: 717-721.
44. Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, et al. (2004) Oestrogen receptor alpha gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res* 6: R437-449.

Citation: Souza MA, da Fonseca AM, Bagnoli VR, de Barros N, Souza Hortense VH, et al. (2014) Clinical Factors Associated with High Mammographic Density in Postmenopausal Women and their Relationship with Dinucleotide *Gtn* Repeat Polymorphism in the Estrogen Receptor Alpha Gene. *J Cancer Sci Ther* 6: 142-147. doi:[10.4172/1948-5956.1000262](https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000262)