

KATHERINE DE SOUZA RODRIGUES

ESTUDO DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO GENE *hTERT* COMO  
POTENCIAIS FATORES DE RISCO OU DE PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE  
MAMA

BRASÍLIA, 2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KATHERINE DE SOUZA RODRIGUES

ESTUDO DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO GENE *hTERT* COMO  
POTENCIAIS FATORES DE RISCO OU DE PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE  
MAMA

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

BRASÍLIA, 2024

KATHERINE DE SOUZA RODRIGUES

ESTUDO DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO GENE *hTERT* COMO  
POTENCIAIS FATORES DE RISCO OU DE PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE  
MAMA

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 04 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Assinaturas eletrônicas no processo SEI nº 23106.147574/2023-62

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira – presidente  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida  
Universidade de Brasília

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosângela Vieira de Andrade  
Universidade Católica de Brasília

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Rodrigo Haddad – suplente  
Universidade de Brasília



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[http://sei.unb.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.unb.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0),  
informando o código verificador **10804040** e o código CRC **58DA3EAE**.

*A Deus, que me inspirou e me deu  
forças para seguir no caminho da  
pesquisa junto ao meu incrível  
orientador, Diêgo Madureira.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A **Deus**, que tornou tudo isso possível. Ainda me lembro do final de 2008, quando me encontrava assustada com o futuro acadêmico e nem imaginava que iniciaria o curso de Farmácia na UnB. Não só concluí a graduação, mas também conheci o meu orientador que me auxiliou até aqui. Em toda essa jornada a mão de Deus me capacitou a fazer o que eu não conseguia, me deu esperança nos momentos que pensei em desistir e abriu portas para que tudo desse certo. Com toda certeza, qualquer conhecimento e sabedoria que adquiri foi por meio dEle. A Ti, meu Deus, é o meu maior agradecimento. Obrigada por todo amor, cuidado e por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida.

Ao meu orientador, **Diêgo Madureira**, que me inspira desde a primeira aula de cancerologia. Obrigada por abraçar a área clínica comigo, mesmo dando muito trabalho com toda a burocracia e nos levando a territórios novos além das bancadas. Obrigada por cada conselho, cada reunião, cada dica e cada apoio. O senhor sempre teve o dom de trazer paz e esperança com o seu jeito sereno e descontraído e, por isso, eu sabia que era só conversar com você que um grande problema se tornaria insignificante. Obrigada por me ensinar a encarar a universidade com muita humildade, dedicação, esperança e nobreza. Obrigada por ser esse exemplo magnífico na área acadêmica. Seguindo essa área, com certeza quero ser como você.

Ao Dr. Ricardo Titze e ao Dr. Fábio Pittela, por acrescentar ao meu projeto durante a qualificação. Obrigada pelas sugestões e por ampliar a nossa visão em relação a nossa pesquisa, foram grandes contribuições.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa da telomerase, que tornaram os dias nos laboratórios muito melhores. Foi muito bom ter a companhia e crescer na vida acadêmica com vocês. Sinto a falta das nossas conversas, desabafos e dos momentos de descontração. O laboratório sem vocês não é o mesmo.

Aos professores e técnicos dos laboratórios de Análises Clínicas/FCE, Rodrigo, Izabel, Nara, Elias e Lorena. Obrigada por ceder equipamentos, reagentes e conhecimento, e também pela confiança no dia a dia. O apoio de vocês foi fundamental para que eu realizasse os experimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Análises Moleculares, que me acolheu e me ajudou a encontrar cada equipamento no novo laboratório. Em especial, às professoras Elaine e Rita, e à Rebecca.

Aos profissionais do CETTRO, em especial o Dr. João, Dra. Miriam e Ms. Karla, que me ajudaram na pesquisa com os pacientes com câncer. Obrigada por me ajudarem com os pacientes, a me ensinar a usar o sistema e por ceder tudo o que precisava para a pesquisa.

Aos órgãos e instituições que contribuíram com esse trabalho, UnB, CNPq, CETTRO, Sabin e Hemocentro de Brasília.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À minha avó Francisca e aos meus tios, primos, amigos e pastores. De várias formas vocês cuidaram de mim, estando presentes fisicamente ou não. Obrigada por toda oração e motivação. Sei que sempre torceram por mim.

E principalmente, aos meus familiares, minha segunda base. Amo vocês! Agradeço aos meus pais, **Romeu e Terezinha**, por investirem na minha educação. Sem o apoio de vocês não teria como continuar com os meus estudos por tanto tempo. Obrigada também pelo cuidado, amor, orações e carinho. Vocês são pais incríveis. E mãezinha, a senhora não existe! Sei que tive momentos desafiadores demais e a senhora não saiu de perto, me motivou, me abraçou e ajudou a me reerguer. Nem sei o que seria de mim sem a sua doce e amável presença. Suas incontáveis orações e declarações mudavam toda a atmosfera ao meu redor. Aos meus irmãos, **Israel e Guilherme**, que sempre torceram por mim. Com o jeito alegre, as brincadeiras e até as implicâncias vocês trouxeram momentos que guardo com carinho. Será o fim da era caverna, Rael?! E por último, mas mais que especial, meu amado esposo, parceiro e companheiro, **André Moura**. A você, que chegou no meio de tudo isso, no momento mais conturbado da pesquisa, muito obrigada por todo apoio. Quantas vezes você me ajudou de consideráveis formas, até mesmo escutando minhas explicações sobre assuntos que nem são da sua área. De você sempre vinham palavras de ânimo, conforto e superação - e não me deixava esquecer de que em Deus eu já tinha tudo o que precisava. Obrigada pela paciência, por me ouvir atentamente, por me ajudar nos momentos que precisava me concentrar e por ser esse porto onde podia descansar e recarregar minhas energias. Definitivamente, você fez diferença nos meus dias, trazendo alegria, leveza, força e muito amor.

## RESUMO

O câncer de mama (CM) é uma das causas mais comuns de morte em mulheres, sendo o tipo de câncer mais frequente nessa população. No desenvolvimento da doença é esperada a ocorrência de alterações genéticas que conferem uma susceptibilidade específica ao CM para aqueles que apresentam certas variações genéticas. Alterações na região promotora do gene *TERT* estão significativamente relacionadas a muitos tipos de câncer e mutações somáticas e SNPs nessa região podem influenciar a susceptibilidade e prognóstico do câncer. Por ser a telomerase uma enzima importante no processo de carcinogênese, por estar presente na maioria dos tumores e pelos indícios de ser um bom marcador molecular, se faz necessária uma investigação mais profunda no tema. Este estudo encontrou 325 genes e 1900 SNPs relacionados ao CM e analisou SNPs na região promotora da telomerase em 108 pacientes com CM e em 108 indivíduos saudáveis, e testou a correlação de tais dados com fatores de risco e prognóstico. 8 SNPs foram analisados: rs2242652, rs964200877, rs540807196, rs980822475, rs10078991, rs1054221410, rs930389112 e rs1433143099. Este é o primeiro estudo que descreve o fator de risco desses polimorfismos para o CM na população do Distrito Federal. Na determinação de fator de risco para CM, apenas o polimorfismo rs10078991 foi próximo do significativo ( $p= 0,06$ ), demonstrando que a ausência do alelo T aumenta o risco de CM em 1,004 vezes. Para o fator prognóstico, a análise do SNP rs10078991 considerou 2 grupos: presença do Alelo C ( $n= 19$ ) e ausência do Alelo C ( $n= 79$ ). Em relação ao receptor de progesterona (RP), houve associação em relação a variante gênica ( $p= 0,0419$ ), demonstrando que o Alelo C está relacionado a maior expressão de RP e que sua ausência (sem Alelo C - genótipo TT) está relacionada a baixa expressão, o que conferiu a este grupo um pior prognóstico em relação ao RP. Para outras variáveis clínicas, o genótipo TT apresentou resultados particulares ao prognóstico do CM. Em relação a um bom prognóstico, mesmo os tumores maiores apresentaram menor comprometimento de linfonodos. Em contrapartida, as seguintes variáveis foram relacionadas a um pior prognóstico: IMC e estadiamento T; e infiltrado inflamatório. Já o grupo Alelo C apresentou melhor relação com um bom prognóstico no CM para: IMC e Estadiamento N1; e infiltrado inflamatório. Esses achados deixam em evidência o SNP rs10078991 para ser utilizado como um marcador para o CM, já que apresentou relevância como fator de risco e prognóstico para o CM.

**Palavras chave:** câncer de mama; telomerase; polimorfismo; *hTERT*; mutação.

## ABSTRACT

Breast cancer (BC) is one of the most common causes of death in women, being the most common type of cancer in this population. During the development of the disease, genetic alterations are expected to occur that confer a specific susceptibility to BC for those who present certain genetic variations. Changes in the promoter region of the *TERT* gene are significantly related to many types of cancer, and somatic mutations and SNPs in this region may influence cancer susceptibility and prognosis. Because telomerase is an important enzyme in the carcinogenesis process, because it is present in most tumors and because of the evidence that it is a good molecular marker, a deeper investigation into the subject is necessary. This study found 325 genes and 1900 SNPs related to BC and analyzed SNPs in the telomerase promoter region in 108 patients with BC and 108 healthy individuals, and tested the correlation of such data with risk and prognostic factors. 8 SNPs were analyzed: rs2242652, rs964200877, rs540807196, rs980822475, rs10078991, rs1054221410, rs930389112 and rs1433143099. This is the first study that describes the risk factor for these polymorphisms for BC in the population of the Federal District. When determining the risk factor for BC, only the rs10078991 polymorphism was close to significant ( $p=0.06$ ), demonstrating that the absence of the T allele increases the risk of BC by 1.004 times. For the prognostic factor, the analysis of the SNP rs10078991 considered 2 groups: presence of C Allele ( $n=19$ ) and absence of C Allele ( $n=79$ ). Regarding progesterone receptor (PR), there was an association in relation to the gene variant ( $p=0.0419$ ), demonstrating that C Allele is related to higher expression of PR and that its absence (group without C Allele – TT genotype) is related to low expression, which gave this group a worse prognosis in relation to PR. For other clinical variables, the TT genotype (group without C Allele) showed particular results for BC prognosis. In relation to a good prognosis, even larger tumors had less lymph node involvement. On the other hand, the following variables were related to a worse prognosis: BMI and T staging; and inflammatory infiltrate. The Allele C group showed a better relationship with a good prognosis in BC for: BMI and N1 staging; and inflammatory infiltrate. These findings highlight the SNP rs10078991 to be used as a marker for BC, as it is relevant as a risk and prognostic factor for breast cancer.

**Keyword: breast cancer; telomerase; polymorphism; *hTERT*; mutation.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização dos tipos mais comuns de câncer de mama, CDI e CLI .....	18
Figura 2 – Posição do gene TERT no cromossomo 5 .....	24
Figura 3 – Gel de agarose a 2% com marcador de 25kb mostrando a banda de 160 pb de 5 amostras de pacientes com CM e controle negativo que foram submetidos a PCR .....	32
Figura 4 – Gel de agarose a 2% com marcador de 100kb mostrando a banda de 160 pb de 4 amostras de doadores saudáveis e controle negativo que foram submetidos a PCR .....	32
Figura 5 – Posição dos polimorfismos .....	42
Figura 6 – Tipos de câncer relatados no histórico familiar do grupo controle .....	43
Figura 7 – Eletroferograma com os polimorfismos analisados (Caso) .....	45
Figura 8 – Eletroferograma com os polimorfismos analisados (Controle) .....	46
Figura 9 – Distribuição de casos por genótipo para os grupos caso e controle para o polimorfismo rs10078991 .....	49
Figura 10 – Classificação quanto a imunohistoquímica .....	54
Figura 11 – Casos quanto a classificação TNM .....	56
Figura 12 – Variáveis associadas a HER2 positivo ou negativo .....	59
Figura 13 – Variáveis associadas ao IMC .....	60
Figura 14 – RE e RP associados a necrose tumoral .....	61
Figura 15 – Variáveis associadas a Ki67 .....	62
Figura 16 – Variáveis associadas ao Grau do tumor .....	63
Figura 17 – Formação dos grupos para a análise estatística do polimorfismo rs10078991 .....	64
Figura 18 – RP associado a variante gênica para o SNP rs10078991 .....	64
Figura 19 – Associação entre Estadiamento T e Estadiamento N .....	67
Figura 20 – Associação entre Estadiamento T e IMC .....	68
Figura 21 – Associação entre Estadiamento N e IMC .....	68
Figura 22 – Associação entre Estadiamento N e Idade ao diagnóstico .....	69
Figura 23 – Variante gênica associada ao Infiltrado inflamatório .....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes mais estudados na revisão .....	35
Tabela 2 – Grau de parentesco para o histórico de câncer familiar .....	44
Tabela 3 – Comparação da distribuição dos grupos caso e controle que participaram da análise de fator de risco .....	44
Tabela 4 – Fator de Risco para polimorfismos do gene <i>hTERT</i> .....	48
Tabela 5 – Dados gerais dos pacientes com câncer de mama .....	51
Tabela 6 – Classificação imunohistoquímica .....	53
Tabela 7 – Grupamento por estágio para o CM .....	55

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tipos de câncer de mama .....	19
Quadro 2 – Polimorfismos <i>hTERT</i> e risco de câncer de mama .....	25
Quadro 3 – Genes com maior número de SNPs relatados e associação com o risco de CM, em estudos de meta-análise e caso-controle .....	36
Quadro 4 – Genótipo e frequência alélica dos polimorfismos no grupo caso .....	45
Quadro 5 – Genótipo e frequência alélica dos polimorfismos no grupo controle .....	47
Quadro 6 – Significado TNM para o CM .....	54
Quadro 7 – Estadiamento, tipo e grau do tumor .....	56
Quadro 8 – Escores para avaliação dos critérios do sistema de classificação Nottingham .....	57
Quadro 9 – Teste de correlação de Spearman .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+	positivo
-	negativo
$\chi^2$	Qui-quadrado
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CETTRO	Centro de câncer de Brasília
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLI	Carcinoma lobular invasivo
CLIS	Carcinoma lobular in situ
CM	Câncer de mama
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER- $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa
FCE	Faculdade de Ceilândia
FS	Faculdade de Ciências da Saúde
GSTM1	Glutathione S-transferase Mu1
GSTT1	Glutathione S-transferase Theta1
HER2	receptor de crescimento epidérmico tipo 2
<i>hTERT</i>	<i>Subunidade catalítica da telomerase humana</i>
IMC	Índice de massa corporal
MTHFR	5,10-metileno tetrahidrofolato redutase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RE	Receptor de estrogênio
RH	Receptores hormonais
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

*TERT*      *Telomerase reverse transcriptase*  
*TERC*      *Componente RNA da telomerase*  
UnB      Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>PREFÁCIO</b> .....	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1. CÂNCER DE MAMA .....	17
1.2. MARCADORES EM CÂNCER DE MAMA .....	20
1.3. POLIMORFISMOS E CÂNCER DE MAMA .....	21
1.3.1. Polimorfismos relacionados a telomerase .....	23
1.3.2. Polimorfismos da telomerase no câncer de mama .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
3.1. POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO RISCO DE CÂNCER DE MAMA .....	29
3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	29
3.2.1. Grupo caso .....	30
3.2.2. Grupo controle .....	30
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA .....	31
3.4. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS .....	31
3.4.1. Análise dos dados do sequenciamento .....	33
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
<b>4. CAPÍTULO 1</b> .....	<b>35</b>
4.1. POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO RISCO DE CÂNCER DE MAMA .....	35
4.1.1. Polimorfismos da telomerase associados ao risco de câncer de mama .....	40
<b>5. CAPÍTULO 2</b> .....	<b>42</b>
5.1. POLIMORFISMOS DA TELOMERASE COMO FATOR DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA .....	42
5.1.1. Caracterização dos grupos .....	42
5.1.2. Polimorfismos no grupo caso .....	44
5.1.3. Polimorfismos no grupo controle .....	46
5.1.4. Determinação do fator de risco para câncer de mama .....	47
5.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO CASO .....	50
5.2.1. Câncer de mama e fatores prognósticos .....	51

5.2.2. Polimorfismo rs10078991 e fatores prognósticos .....	63
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
ANEXO A: Parecer CEP/FCE/UnB .....	80
ANEXO B: TCLE CETTRO .....	81
ANEXO C: Voucher para coleta de sangue no Sabin .....	82
ANEXO D: Parecer CEP/FS/UnB .....	83
ANEXO E: TCLE Hemocentro .....	84
ANEXO F: Formulário para coleta de dados .....	87
ANEXO G: Artigo submetido .....	88

## PREFÁCIO

O presente trabalho foi desenvolvido como contribuição à pesquisa do câncer, auxiliando o conhecimento sobre a telomerase, enzima relacionada a imortalização celular na carcinogênese e presente na maioria dos tumores. Esta tese apresenta resultados de uma pesquisa iniciada em 2018, envolvendo pacientes com câncer de mama e indivíduos saudáveis do Distrito Federal, polimorfismos da telomerase e fatores de risco e prognóstico.

Os resultados foram divididos em dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão sobre polimorfismos e risco de câncer de mama, abordando inclusive polimorfismos da telomerase relacionados ao risco de câncer de mama. O segundo capítulo expõe os resultados do projeto, iniciando com a descrição dos grupos caso e controle e seguindo com a descrição dos achados relacionados aos fatores de risco para cada polimorfismo. Posteriormente é descrito os dados clínicos do grupo caso, explicando as variáveis clínicas do câncer de mama e o significado prognóstico delas, apresentando também a associação dessas variáveis com um polimorfismo da telomerase para verificar seu valor prognóstico.

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo utilizado para definir uma série de doenças que têm em comum alterações moleculares que fazem com que as células assumam novas características, tais como crescimento e proliferação indiscriminada, podendo afetar quase qualquer parte do corpo (1,2). O câncer surge quando as células sofrem danos não-reparáveis no ácido desoxirribonucleico (DNA) que por variáveis mecanismos provocam mutações em genes responsáveis pela regulação celular, gerando uma célula sem equilíbrio nos processos de proliferação e morte, iniciando assim a formação de neoplasias – mais usualmente reconhecidas como tumores (3,4).

Tabagismo, má alimentação, sedentarismo, alterações reprodutivas, crescimento e envelhecimento da população são exemplos de fatores que influenciam na patogênese do câncer (5). As causas do câncer são variadas e podem ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas internas são mutações aleatórias e predisposições genéticas (2,6).

Mundialmente espera-se que a ocorrência do câncer aumente, a cada ano, devido ao crescimento e envelhecimento da população, além dos frequentes hábitos e fatores de estilo de vida relacionados ao câncer (7). No Brasil, a estimativa para o ano de 2024 aponta para a ocorrência de aproximadamente 704 mil casos novos de câncer, sendo os cânceres de pele não melanoma, próstata, mama, cólon, reto, pulmão e estômago os mais incidentes. Os mais frequentes, por sexo, serão o câncer de mama em mulheres (74 mil casos) e o câncer de próstata em homens (72 mil casos) – excluindo-se o câncer de pele não-melanoma (8).

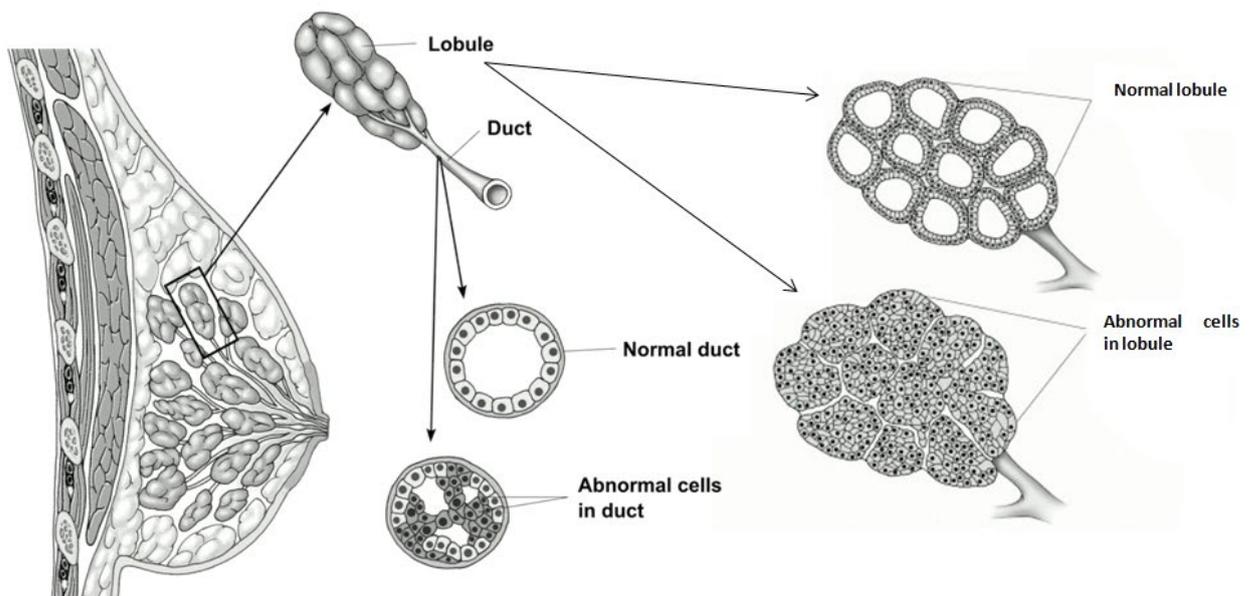
### 1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CM) é uma doença multifatorial e poligênica e representa uma das causas mais comuns de morte em mulheres, sendo o tipo de câncer mais frequente nessa população (9,10). Dentre os fatores de risco, se destacam idade superior a 40 anos, história de algumas doenças proliferativas da mama, história de CM na família de primeiro grau, menstruação precoce, menopausa tardia, nuliparidade, consumo de contraceptivos orais, tabagismo, consumo de álcool, amamentação e atraso na idade do primeiro parto (9,11). Os antecedentes genéticos

ou a história familiar são responsáveis por cerca de 20-25% da incidência global de CM (11).

No desenvolvimento da doença é esperada a ocorrência de alterações genéticas somáticas em oncogenes e genes supressores de tumor (12), que conferem uma susceptibilidade específica ao CM para aqueles que apresentarem certas variações genéticas (13). Alguns loci genéticos já são conhecidos pela relação com susceptibilidade ao CM, como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2* e *PALB2*, e representam 15 a 20% do risco genético de CM (11).

O CM geralmente começa nas células epiteliais luminais da glândula mamária (14). Sobre os tipos de cânceres, a maioria são carcinomas - começam nas células que revestem os órgãos e tecidos (células epiteliais). O carcinoma mamário começa nos ductos (ductos do leite) ou nos lóbulos (glândulas produtoras de leite) – Figura 1. Existem outros tipos de cânceres de mama, como sarcomas, que começam nas células do músculo, gordura ou tecido conjuntivo. Às vezes, um único tumor de mama pode ser uma combinação de diferentes tipos (15).



Carcinoma ductal invasivo

Carcinoma lobular invasivo

Figura 1 – Localização dos tipos mais comuns de câncer de mama, CDI e CLI (Fonte: Adaptado de 15)

Os tipos mais comuns de CM são carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular invasivo (CLI) – Quadro 1. O *in situ* não se

espalha, já o invasivo ou infiltrando se espalham para o tecido mamário circundante (15).

Quadro 1 – Tipos de câncer de mama

<b>Tipos comuns</b>	
Carcinoma ductal in situ (CDIS)	Conhecido como carcinoma intraductal, é um CM não-invasivo ou pré-invasivo.
Carcinoma lobular in situ (CLIS)	Pode ser chamado de neoplasia lobular. As células que parecem cancerosas estão crescendo nos lóbulos das glândulas produtoras de leite da mama, mas não crescem através da parede dos lóbulos.
Carcinoma ductal invasivo (ou infiltrante)	O tipo mais comum de CM. Inicia-se em um ducto de leite da mama mas atravessa a parede do ducto e cresce no tecido adiposo da mama.
Carcinoma lobular invasivo (ou infiltrante)	Inicia-se nas glândulas produtoras de leite (lóbulos). Como o CDI, ele pode se espalhar para outras partes do corpo.
<b>Tipos especiais</b>	
Carcinoma adenóide cístico (ou adenocístico)	Carcinoma mucinoso (ou coloide)
Carcinoma adenosquamous de baixo grau	Carcinoma papilar ou micropapilar
Carcinoma medular	Carcinoma tubular
Carcinoma metaplásico	Carcinoma misto
<b>Tipos raros</b>	
Câncer de mama inflamatório	Um tipo incomum de CM invasivo. Representa cerca de 1% a 3% de todos os cânceres de mama.
Doença de Paget do mamilo	Começa nos dutos da mama e se espalha para a pele do mamilo e, em seguida, para a aréola. Representa cerca de 1% de todos os casos de CM.
Tumor de Phyllodes	Desenvolve no tecido conjuntivo (estroma) da mama, em contraste com carcinomas, que se desenvolvem nos ductos ou lóbulos.
Angiossarcoma	Inicia-se em células que alinham vasos sanguíneos ou vasos linfáticos

(Fonte: Adaptado de 15)

O diagnóstico e o tratamento precoce podem conferir boa resposta ao tratamento e aumentar a chance de cura, por isso a observação pessoal e o

rastreamento a partir dos 50 anos devem ser adotados. Os sinais e sintomas mais característicos são nódulo endurecido, fixo e geralmente indolor, alterações no mamilo, nódulo na região das axilas e pescoço, saída espontânea de líquidos dos mamilos, pele da mama avermelhada, retraída ou com aspecto de laranja. Para o rastreamento, é recomendado a mamografia a partir dos 50 anos, que deve ser realizado a cada 2 anos, até os 69 anos (16).

Para melhor entendimento da implicação dos fatores prognósticos no CM, outros parâmetros relacionados estarão descritos no tópico 4.3.1 (Câncer de mama e fatores prognósticos), na seção Resultados e Discussão.

## 1.2. MARCADORES EM CÂNCER DE MAMA

As variações nas características moleculares de um mesmo tipo de câncer mostraram a importância de se tomar medidas preventivas ou definir tratamentos levando em consideração as características individuais (17–19) e tornou a busca por novos alvos terapêuticos, nos vários subtipos moleculares de câncer, um dos principais objetivos na investigação molecular do câncer (20). Essa evolução entre a melhora no diagnóstico e criação de terapias adaptada ao genoma individual acontece principalmente através do desenvolvimento do campo da farmacogenômica (21).

Parte do sucesso da redução da mortalidade por câncer está ligado ao desenvolvimento de programas de detecção e prevenção precoces (22). Os biomarcadores podem ser usados para a detecção precoce da doença em indivíduos assintomáticos (23). Perfis de genes, proteínas e metabólitos de biofluidos (soro, plasma e urina) são frequentemente usados na detecção do câncer (24). Isto é possível por causa das alterações celulares diferentes presentes no organismo que tem a doença (23). Através da genética o estudo de polimorfismos auxiliaria na descoberta desses biomarcadores para prevenção, antecipação de diagnóstico e manejo clínico (25).

No CM já existem marcadores clássicos extremamente importantes e utilizados na clínica. O *BRCA1* e *BRCA2* estão relacionados a estabilidade genômica e reparo de DNA, regulando a progressão do ciclo celular e atuando como supressores de tumor (26). Aproximadamente 80% dos portadores de mutações desses genes podem desenvolver CM (27). O *TP53* também é um gene supressor de tumor que atua na regulação do ciclo celular, no reparo de danos ao DNA e na sobrevivência celular sob

estresse genotóxico. Mutações nesse gene estão presentes em 30 a 50% dos tumores e são mais frequentes naqueles indivíduos que possuem mutações em *BRCA1* e *BRCA2* (26). Outros marcadores com destaque no CM estão relacionados a sua classificação molecular e são utilizados na clínica para definir prognóstico e tratamento, como o Ki67, receptor de progesterona (RP), receptor de estrogênio (RE) e receptor de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (18). Um subtipo molecular conhecido como triplo-negativo, por exemplo, possui RP, RE e HER2 negativos, conferindo ao paciente um mau prognóstico e tratamento mais limitado por não responder ao tratamento comum, como as terapias hormonais e ao trastuzumabe (18). O uso das informações de genes relacionados a CM, como os mencionados acima, tem auxiliado a detecção precoce (27) e a definição de prognóstico e tratamentos – cirurgia e variação das respostas à quimioterapia e radioterapia, por exemplo (26).

### 1.3. POLIMORFISMOS E CÂNCER DE MAMA

O termo “polimorfismo” descreve uma variação genética em uma população. Isso ocorre por conta das mutações, que proporcionam a base para a variação genética, evolução e análise genética (28). Enquanto uma mutação está relacionada a alteração na sequência do DNA, o polimorfismo está relacionado a mutações com uma frequência de 1% ou mais em uma população. Para a área clínica, o termo pode ser utilizado para qualquer gene ou nucleotídeo para o qual mais de uma forma é encontrada na população, independente da frequência da mutação (29).

Essas alterações no DNA podem ser germinativas, herdáveis e a base da transmissão da diversidade genética e da evolução, bem como das doenças genéticas; ou somáticas, não herdáveis, mas podem levar a funções celulares alteradas e a tumores, por exemplo (28). A implicação dessas alterações, para a clínica, está relacionada a uma mudança de genótipo com ou sem alteração do fenótipo. A alteração do fenótipo resulta na variação da expressão daquela sequência, causando, por exemplo, mudança de medida bioquímica, estado fisiológico, presença de um antígeno ou característica física (29). O grau de mudança depende do grau de alteração que a mutação provoca no funcionamento do produto gênico (28).

Apesar da grande variabilidade nos fenótipos dos seres humanos, em 99,9% da sequência genética não há variação. Aproximadamente, a cada 1000 pares de bases do genoma há 1 polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) – em torno de 3

milhões de SNPs por pessoa. Embora a maioria dos SNPs não apresentem consequências em relação à expressão clínica, um subgrupo de SNPs apresenta implicações clínicas e é responsável por grande parte da diversidade humana observada (30).

Por ser fonte de variação genética humana, os SNPs podem contribuir para a suscetibilidade de um indivíduo ao câncer (20). Essa susceptibilidade pode ser influenciada pelo papel do gene e pela alteração que o polimorfismo pode ocasionar.

A glutatona S-transferase, por exemplo, é uma enzima que protege as células contra lesões químicas, evitando o acúmulo de quinonas que promoveriam a formação de adutos de DNA com potencial carcinogênico (10,31). Essa enzima pode sofrer a influência de polimorfismos nulos que promovem a ausência de expressão e a perda da atividade da enzima, contribuindo para a manutenção do tumor. Dois SNPs que atuam nessa via são a Glutatona S-transferase Mu1 (GSTM1) e Glutatona S-transferase Theta1 (GSTT1). Um estudo no norte da Índia encontrou associação de deleções gênicas, nomeado de polimorfismo nulo, de GSTM1 com o risco de CM (OR= 2,231; IC95%= 1,332–3,737; p= 0,002), mas não houve associação com o genótipo nulo de GSTT1 (32). Outro estudo, numa população filipina, não encontrou diferença significativa entre os grupos caso e controle de ambos polimorfismos (33). Outras pesquisas encontraram associação desses polimorfismos com o risco de CM em estudos com os genótipos nulos combinados de GSTM1 e GSTT1 (OR= 10,80; IC95%= 1,16–100,43) em Mizoram - Nordeste da Índia (34), GSTM1 em brasileiros (OR= 2,4; IC95%= 1,1–5,6; p= 0,04) (35) e em ganenses com GSTT1 (OR= 2,84; IC95%= 1,52–5,29; p=0,001) e combinação de GSTT1 nulo e GSTM1 presente (OR= 3,02; IC95%= 1,61–5,66; p= <0,001) (36).

O gene *ESR1* codifica o receptor de estrogênio, que em tumores ativa a transcrição de genes ligados a proliferação celular, sendo o principal impulsionador da tumorigênese no CM (37). Portanto, polimorfismos nessa região podem estar relacionados ao aumento ou diminuição do risco de CM (38). A revisão de Jahandoost, Farhangian e Abbasi descreveu estudos que encontraram associação entre polimorfismos do gene *ESR1* e risco de CM: ER1002, rs2077647 e rs827421 na população judaica; rs2077647, rs1801132 e rs2228480 no Irã, rs851982 na população americana; rs851984, rs2881766, rs1801132 e rs910416 na Alemanha (14). Apesar do resultado, esses e outros autores mostram divergências nas associações e apontam para a importância de se considerar fatores que podem implicar nessas

diferenças, como diferentes etnias, interação entre genes, desequilíbrio de ligação entre locais de SNPs, ambiente e estilos de vida, que podem contribuir distintamente para a tumorigênese (14,39).

### 1.3.1. Polimorfismos relacionados a telomerase

Outro gene que tem demonstrado relevância no câncer é o da telomerase. Alguns estudos têm ligado o polimorfismo de genes relacionados a telomerase com a susceptibilidade e/ou sobrevivência do câncer (40). Alterações na região promotora do gene da *transcriptase reversa da telomerase (TERT)* estão significativamente relacionadas a muitos tipos de câncer e mutações somáticas e SNPs nessa região podem influenciar a susceptibilidade e prognóstico do câncer (41).

A enzima telomerase reconstrói os telômeros após cada ciclo mitótico, provocando importantes efeitos sobre as células – imortalização (20,42). A atividade da telomerase é ausente na maioria dos tecidos somáticos humanos normais mas é frequentemente detectável em quase todos os tipos de tumores, reforçando a importância da telomerase no desenvolvimento de câncer (43).

Os telômeros consistem em repetições de nucleotídeos em tandem da sequência (TTAGGG) $n$  (44), e são essenciais para proteger terminais cromossômicos contra a degradação, fusão e rearranjo de ponta a ponta (20,43). No processo celular, quanto mais vezes uma linhagem se divide, mais o tamanho do telômero de seus cromossomos diminui, até que atingem um tamanho mínimo que limita novas divisões celulares porque o DNA não pode mais ser duplicado – processo de senescência celular (45). Esse processo ocorre porque a DNA polimerase é incapaz de replicar a extremidade dos cromossomos (40).

Alterações que promovem o alongamento dos telômeros evitariam a senescência e consequente morte celular, permitindo uma regeneração contínua – processo de imortalização. Dessa forma, o aumento do número de ciclos celulares associados a telômeros longos poderia resultar em maior potencial de mutação e consequente desenvolvimento do câncer (40). A telomerase faz esse papel ao reconhecer o 3' hidroxil (3' OH) no final da saliência da fita G e adicionar sequências de repetição telomérica às extremidades dos cromossomos (20). Assim, as células tumorais podem utilizar a telomerase para prevenir a perda dos telômeros (20).

A telomerase funcional é composta pela proteína TERT e pelo componente de RNA de telomerase (TERC) que atua como um molde para a síntese de DNA. A expressão da subunidade catalítica da telomerase humana (hTERT) é capaz de restaurar o comprimento dos telômeros, evitando o processo de senescência e tornando a célula imortalizada (20,42). A imortalização celular permite que os tumores cresçam e dá tempo às células pré-cancerosas ou cancerosas para acumularem mutações adicionais. Na maioria dos casos, se a telomerase for bloqueada nas células cancerosas, seus telômeros encurtarão de novo sempre que se dividirem, levando a apoptose ou à crise (46).

O gene *TERT* é localizado no braço curto do cromossomo 5, na posição 15.33 (5p15.33) – Figura 2, e é composto por 16 éxons (47,48). Mutações nas suas regiões codificantes podem afetar a atividade da telomerase e gerar fenótipos clínicos graves, como um aumento na frequência do câncer (48). A ativação da telomerase, presente na maioria dos tumores, é uma etapa vital na progressão de diversos tipos de câncer (49). Atualmente, *TERT* é um dos marcadores tumorais mais comuns (48). O estudo dos polimorfismos dos genes responsáveis pela expressão da telomerase pode contribuir na determinação do prognóstico, influenciando a susceptibilidade do hospedeiro à progressão tumoral e metástase (50).

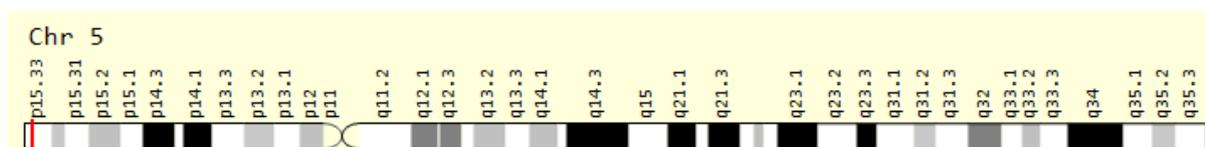


Figura 2 – Posição do gene TERT no cromossomo 5

Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TERT>

Duas metanálises sugeriram a associação do polimorfismo rs2853669 a um aumento do risco de câncer, principalmente para o câncer de pulmão (41,51). SHEN, N. et al ainda forneceu evidências para a utilidade clínica da combinação das mutações rs2853669 e promotor da *TERT* como biomarcadores do prognóstico do câncer (20). Outro estudo indicou associações significativas entre os polimorfismos rs2736098 *TERT* e risco de câncer, sendo que o alelo A no polimorfismo rs2736098 G>A contribuiu para a suscetibilidade ao câncer em muitos tumores malignos, especialmente em câncer de pulmão e bexiga. Também foi encontrada associação do

polimorfismo com o risco de diversos tipos de câncer (52). O estudo de PANG, T. et al associou o mesmo polimorfismo ao risco de câncer na análise geral (47). Uma metanálise relatou que o polimorfismo *TERT* rs2736100 confere maior risco geral ao câncer (16-39%), sugerindo que este SNP pode contribuir para a carcinogênese (5).

Além da sua função no alongamento do telômero, tem sido relatado o envolvimento da TERT em vias biológicas de processos fisiológicos, como função de células-tronco, homeostase de tecidos e envelhecimento e oncogênese, além de atuar como (co-)fator de transcrição para regular a expressão gênica (53).

### 1.3.2. Polimorfismos da telomerase no câncer de mama

Uma meta-análise realizada pelo grupo, envolvendo 12986 casos, 16758 controles e 28 polimorfismos do gene *hTERT*, estudou a associação do CM a polimorfismos da telomerase (25). As descrições dos principais achados sobre polimorfismos da telomerase e o risco de CM estão detalhados no Quadro 2.

Quadro 2 - Polimorfismos hTERT e risco de câncer de mama

Polimorfismos	Associação com risco de CM	OR
rs2735940; rs2736109; rs2853669	Sem associação	-
rs2736098	Nas populações turca, polaca e iraniana, o genótipo GG aumentou significativamente o risco de CM, comparado ao genótipo AA	OR= 1,88, IC 95% 1,04-3,40 e p= 0,034; OR= 0,76, IC 95% 0,58-1,00 e p= 0,05; OR= 1,87, IC 95% 1,19-2,94 e p= 0,006; respectivamente.
rs10069690	Associação na população branca não-hispânica dos EUA e na população hispânica e mexicana dos EUA	OR= 1,13, IC 95% 1,03-1,24
	Associação ao risco aumentando de CM RE negativo	OR= 1,18, IC95% 1,13-1,25, p= 1x10 <sup>-10</sup>
rs2853676	Associação com o risco global de CM na população branca não-hispânica dos EUA e na população hispânica e mexicana dos EUA	OR= 1,23, IC 95% 1,00-1,5

	Associação não confirmada na ascendência africana	OR= 1,03, IC 95% 0,91-1,16
rs2736100	Associação ausente nos turcos e africanos ancestrais	-
	Possível fator de risco para mulheres na pós-menopausa em brancos não-hispânicos dos EUA e hispânicos e mexicanos dos EUA	OR= 1,20, IC 95% 1,01-1,42
rs2853690; rs7712562; rs2853677; rs7726159; rs13167280; rs401681; rs2075786; rs2736099; rs3816659; rs4975616; rs402710; rs11133719; rs31489	Sem resultados estatisticamente significativos	-

Fonte: Adaptado de (25)

Como fator prognóstico em CM, a variante rs2853677 demonstra uma tendência reduzida de mortalidade específica por CM (alelo T; HR = 0,57, IC 95% 0,39–0,84), já a variante rs2735940 não teve associação significativa com parâmetros clínico-patológicos (25).

As associações encontradas entre variantes do gene *hTERT* demonstram que fatores de risco e fatores prognósticos podem contribuir com o tratamento do câncer, já que o polimorfismo pode ser identificado antes do diagnóstico (25). Entretanto, é perceptível a controvérsia em alguns resultados, principalmente em relação a variabilidade em distintas populações e associações discretas. Isso reforça a importância do estudo de polimorfismos em diferentes grupos étnicos, por mais que em determinada população as associações possam ser ausentes.

Em um trabalho anterior – projeto do mestrado do programa da Pós-Graduação em Ciências da Saúde – foi estudado o polimorfismo da telomerase rs2736100 em pacientes com CM. Foi identificada uma deleção em 11,11% da população estudada que ainda não havia sido relatada na literatura e demonstrou-se que o polimorfismo tinha associações com variáveis clínicas e de prognóstico do CM – associação entre genótipo e estadiamento T do tumor ( $p= 0,0491$ ,  $n= 32$  e teste do  $X^2$ ), sendo que o genótipo GG e a deleção apresentaram melhor prognóstico para o estadiamento T; e associação entre os genótipo GG/AG e deleção ao tipo de tumor ( $p= 0,0045$ ,  $n= 47$  e teste do  $X^2$ ), mostrando que não houve deleção apenas nos casos

de CLI (54). Entretanto, houve limitações pelo pequeno número de amostras (n=96) e ausência de alguns dados clínicos.

Uma vantagem do estudo de polimorfismos gênicos é que, por se tratarem estes de características genéticas do indivíduo, é possível acessar tais informações a qualquer tempo, mesmo antes da doença diagnosticada (nos casos de pacientes com histórico familiar, por exemplo), permitindo a antecipação de condutas. Conforme o exposto fica evidente a importância da busca de novos marcadores para o CM. Por ser a telomerase uma enzima importante no processo da carcinogênese, por estar presente na maioria dos tumores e pelos indícios de ser um bom marcador molecular, é interessante investigar se os polimorfismos no gene *hTERT* podem ter influência na carcinogênese e no risco de CM.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a relevância clínica de polimorfismos em câncer de mama, especialmente aqueles relacionados a telomerase, e analisar polimorfismos do gene da telomerase em uma população do Distrito Federal (DF)

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os principais polimorfismos associados ao risco de câncer de mama
- b) Identificar se dentre esses polimorfismos há algum relacionado ao gene da telomerase
- c) Analisar polimorfismos na região promotora do gene da telomerase possivelmente associados com o fator de risco para o câncer de mama
- d) Estudar as associações dos polimorfismos com os fatores prognósticos
- e) Descrever a população estudada quanto aos aspectos clínicos relevantes

### 3. METODOLOGIA

Este trabalho foi conduzido por meio de revisão e estudo clínico observacional.

#### 3.1. POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO RISCO DE CÂNCER DE MAMA

Para verificar os polimorfismos associados ao risco de CM, foi realizada uma revisão no Pubmed, com os mesh Termos: polymorphism[title] OR polymorphisms[title] AND breast cancer risk[title], onde foram selecionados os artigos publicados nos últimos 10 anos. Os artigos que não abordavam polimorfismos com risco para o CM e que não estivessem no idioma inglês foram excluídos. Inicialmente foi realizada a leitura dos títulos de 329 artigos. Para qualquer dúvida sobre inclusão de artigo, a opinião de um segundo leitor foi requisitada. Após a leitura dos títulos, 307 artigos foram selecionados para a leitura do resumo. Esses artigos foram salvos em uma coleção eletrônica da plataforma Pubmed ("Collections"). A leitura dos resumos resultou na exclusão de 80 artigos. Para a revisão, 227 artigos foram utilizados na íntegra.

Para a coleta de dados dos artigos foi criado um banco de dados gerais em uma planilha do Excel, onde foram tabulados os seguintes dados:

- Dados gerais do artigo: número do artigo na coleção, tipo de estudo, DOI e ano
- Resultados: caso, controle, etnia, gene, polimorfismo, associação, conclusão, intercorrência e observação.

Após a leitura dos artigos e a tabulação das informações relevantes, os dados da planilha foram filtrados e foi criada uma segunda planilha com as informações: gene, quantidade de artigos, polimorfismos, número do artigo e associação. Através dessa planilha foi possível identificar a quantidade de genes e polimorfismos relatados, os genes e polimorfismos mais estudados e o tipo de associação por polimorfismo. Com essas informações, uma terceira planilha foi elaborada com o intuito de deixar os dados mais resumidos por gene, com as seguintes informações: gene, número de artigos e quantidade de polimorfismos analisados.

#### 3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para o estudo do fator de risco foi constituído dois grupos: caso, para os pacientes com CM, e controle, para os indivíduos saudáveis, sem câncer.

### 3.2.1. Grupo caso

A população de estudo foi constituída por pacientes com diagnóstico de CM atendidas no Centro de Câncer de Brasília (CETTRO). A proposta integra o projeto de pesquisa “Estudo de mutações relacionadas ao gene *hTERT* em pacientes com câncer no Distrito Federal”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ceilândia (CEP/FCE) da Universidade de Brasília (UnB) sob o número CAAE: 98798718.9.0000.8093 (Anexo A).

A amostra do estudo se constitui do banco do biorrepositório e pacientes com diagnóstico de câncer que aceitaram participar do estudo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B) foi aplicado para os pacientes atendidos no CETTRO, por médicos associados ao estudo. Os dados clínicos foram obtidos através dos prontuários e utilizados para a alimentação de um banco de dados. As variáveis coletadas foram: sexo, idade, altura, peso, idade ao diagnóstico do câncer, tipo de neoplasia, informações de imuno-histoquímica pré-operatória e da peça do tumor, tipo de cirurgia, tamanho e grau do tumor e linfonodos acometidos. O paciente que não possuía no prontuário os dados clínicos foi excluído do estudo.

Para a coleta do material biológico o paciente que aceitou participar da pesquisa recebeu um voucher (Anexo C) e demais informações para a coleta de sangue. Foi coletado 4 mL de sangue periférico em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) específico para biologia molecular. A coleta e o armazenamento inicial da amostra foram realizados pelo Laboratório Sabin/DF – sem qualquer custo para o paciente. As amostras coletadas durante a semana foram transportadas ao Laboratório de Análises Clínicas da FCE/UnB e processadas para a extração do DNA.

### 3.2.2. Grupo controle

Para estudo de determinação de fator risco para o CM, o grupo controle foi formado por amostras de indivíduos saudáveis, provenientes de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília, que integram biorrepositório específico. A proposta integra o projeto de pesquisa “Estudo de polimorfismos do gene *hTERT*

como potenciais fatores de risco para o câncer em pacientes do Distrito Federal”, aprovado pelo CEP da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) - CEP/FS - da UnB sob o número CAAE: 66909022.0.0000.0030 (Anexo D).

Os doadores de sangue do Hemocentro foram convidados a participar do projeto e para aqueles que aceitaram foi aplicado o TCLE (Anexo E) e um formulário para coleta de dados (Anexo F). O material coletado para a análise já fazia parte da doação de sangue, uma amostra de 4 mL coletada em tubo com EDTA e enviado para o setor de imuno-hematologia do Hemocentro. Após solicitação da amostra feita diretamente ao setor, a amostra era liberada para a pesquisa e o botão leucocitário (buffy coat) era coletado e armazenado em um eppendorf, e transportado para o Laboratório de Análises Moleculares na FCE/UnB, onde finalmente era processado para a extração do DNA.

### 3.3. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada através do kit comercial Pure Link Genomic DNA mini kit (cat no. K1820-01, Invitrogen By Thermo Fisher) para as amostras do grupo caso e o kit comercial Genomic DNA from Tissue (NucleoSpin Tissue, Bioanalysis, Macherey-Nagel) para as amostras do grupo controle. Após a extração foi determinada a concentração e pureza do DNA extraído, através do equipamento NanoDrop One (Thermo Scientific, Madison, USA). As amostras eram aliqüotadas e congeladas a -80 °C.

### 3.4. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS

O estudo dos polimorfismos foi realizado através da análise das sequências e dos eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento do DNA, das novas amostras e daquelas que fazem parte do biorrepositório iniciado no mestrado. Para isso, inicialmente foi feita a amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR) convencional com utilização de primers específicos desenhados para esse fim. A região de interesse, que foi amplificada, foi selecionada por ser sinalizada com diversos polimorfismos que abrangem a região promotora do gene *hTERT*. As sequências iniciadoras foram: R: 5'-GACACGGATCCAGGACCTC-3' e F: 5'-GGTGCCTCCAGAAAAGCAG -3' (55).

O procedimento de PCR foi realizado sob condições padrão numa mistura reacional de 20  $\mu$ l, contendo: 20 nanogramas de DNA extraído; 0,5  $\mu$ M de cada iniciador; 0,2 mM de desoxirribonucleótidos fosfatados; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,03U de polimerase Ampli Taq (Uniscience Corporation, Miami, USA, 5U/ $\mu$ l); e tampão adequado (fornecido pelo fabricante). As condições de reação foram as seguintes: 95°C durante 12 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 30s, 58.5°C durante 30s, 72°C durante 30s; e 72°C durante 5 min.

Os fragmentos de DNA, em seguida, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para verificação de tamanho da banda, condição de controle negativo e presença de banda única (Figura 3 e 4).

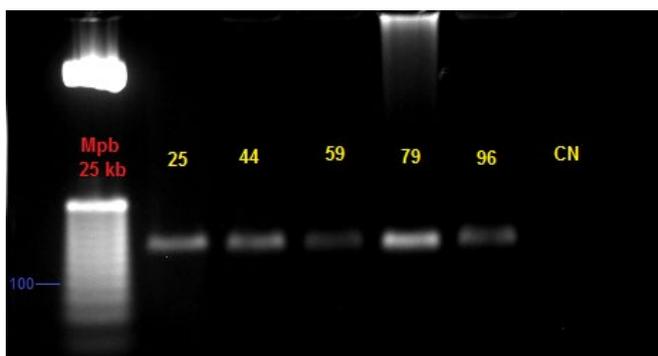


Figura 3 – Gel de agarose a 2% com marcador de 25kb mostrando a banda de 160 pb de 5 amostras de pacientes com CM e controle negativo que foram submetidos a PCR.

Legenda: CN: controle negativo; kb: kilobases; Mpb: marcador de pares de base.

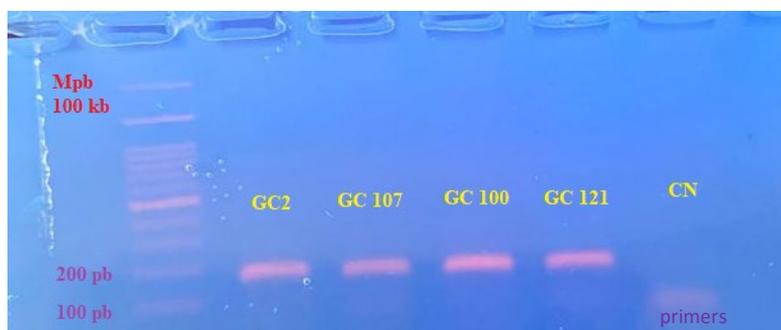


Figura 4 – Gel de agarose a 2% com marcador de 100kb mostrando a banda de 160 pb de 4 amostras de doadores saudáveis e controle negativo que foram submetidos a PCR.

Legenda: CN: controle negativo; GC: grupo controle; kb: kilobases; Mpb: marcador de pares de base pb: pares de bases;

Para a realização do sequenciamento os produtos de PCR foram novamente quantificados, padronizados para 60 nanogramas e submetidos a um processo de secagem em termobloco a 70°C por 1 hora. As amostras foram enviadas pelos correios ao ACTGene Análises Moleculares Ltda (Alvorada, Rio Grande do Sul), empresa responsável pelo sequenciamento das amostras. O equipamento utilizado pela empresa foi o sequenciador AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), que utiliza o método Sanger.

#### 3.4.1. Análise dos dados do sequenciamento

Para a análise do resultado do sequenciamento foi utilizado o software Chromas Lite (versão 2.01, Technelysium Pty Ltd.). Os eletroferogramas foram conferidos para estabelecer a qualidade do sequenciamento na região de interesse de cada amostra. Aquelas amostras que não apresentaram bom sequenciamento, sem a possibilidade de definição do tipo de base e da sua posição, foram descartadas. As amostras que seriam analisadas foram salvas em arquivo fasta para ser feito o alinhamento. O alinhamento foi aplicado pelo software Clustal X (versão 2.1, [http://www.clustal.org/download/clustalx\\_help.html](http://www.clustal.org/download/clustalx_help.html)).

Para a identificação dos polimorfismos, foi comparada a sequência da região fornecida pelo dbSNP (NCBI) com o alinhamento para verificar a posição de cada SNP. Após a identificação, o banco de dados do grupo caso e controle foi preenchido com as informações do resultado de cada polimorfismo.

### 3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise descritiva dos dados coletados foi realizada através do cálculo de medidas de tendência central e medidas de dispersão adequadas para cada variável quantitativa, na dependência da distribuição de frequência das mesmas, e de frequência absoluta e relativa (preferencialmente percentagem) para as variáveis qualitativas, como é o caso das alterações encontradas. As análises principais (que respondem às questões da pesquisa) utilizaram o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As análises secundárias foram realizadas por recategorização dos grupos pelas variáveis de interesse e realização de testes de correlação paramétricos ou não paramétricos,

a depender da distribuição dos dados, para variáveis quantitativas, e  $\chi^2$  com correção de Fisher para os demais.

Para todos os testes foi considerado o valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

O software *GraphPad Prism* versão 10 para Windows foi utilizado nas análises e plotagem dos dados na forma gráfica. Regressões lineares e não lineares, quando aplicáveis, foram feitas utilizando-se modelos de equação logarítmica da biblioteca do programa e só foram consideradas para efeito de cálculos quando o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) foi superior a 0,9. Os valores de  $p$  adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles inferiores a 0,05.

## 4. CAPÍTULO 1

### 4.1. POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO RISCO DE CÂNCER DE MAMA

A busca no Pubmed por polimorfismos associados ao risco de CM resultou na análise de 227 artigos. A revisão permitiu demonstrar a vasta quantidade de estudos envolvendo polimorfismos e sua associação com risco de CM. Nessa revisão, mais de 325 genes e 1900 polimorfismos foram encontrados.

Os genes com mais artigos foram: *5,10-metileno tetrahidrofolato redutase* (*MTHFR*), *ESR1* - do receptor de estrógeno alfa ( $ER-\alpha$ ), *GSTM1* e *GSTT1* - Tabela 1.

Tabela 1 – Genes mais estudados na revisão

Gene	Número de artigos	Polimorfismos
<i>MTHFR</i>	16	<b>6:</b> rs1801133, rs1801131, rs9651118, rs13306553, rs12121543, rs4846048 <b>35:</b> rs910416, rs3798577, rs2228480, rs750686, rs3020366, rs6905370, rs3020407, rs726282, rs3020405, rs1884054, rs1884051, rs3020401, rs3020396, rs3020394, rs3020317, rs3020390, rs3020377, rs3020314, rs1801132, rs712221, rs9322331, rs851982, rs851984, rs9340799, rs1062577, rs3798377, rs2273206, rs926778, rs2077647, rs2881766, rs9383951, rs3734805, rs3757318, rs2234693, rs2046210
<i>ESR1</i>	10	rs3020377, rs3020314, rs1801132, rs712221, rs9322331, rs851982, rs851984, rs9340799, rs1062577, rs3798377, rs2273206, rs926778, rs2077647, rs2881766, rs9383951, rs3734805, rs3757318, rs2234693, rs2046210
<i>GSTM1</i>	9	<b>1:</b> nulo
<i>GSTT1</i>	9	<b>1:</b> nulo

Para o gene *MTHFR*, o polimorfismo mais avaliado foi o rs1801133, onde 12 artigos associaram o SNP ao risco de CM e envolvia estudos de meta-análise (7 artigos) e caso-controle [Irã [(1 artigo), China (3 artigos), e população não descrita (1 artigo)]. Entretanto, um caso-controle realizado na Grécia sugeriu que não havia associação do gene com o CM nessa população e outros 3 estudos, todos casos-controle [Grécia (1) e China (2)], não encontraram associação significativa.

Os polimorfismos mais analisados no gene *ESR1* foram o rs2046210 e o rs2234693. O rs2046210 foi relatado em 4 estudos, e encontrou associação com o risco de CM em todos. Já o rs2234693, relatado em 3 estudos, apresentou resultado divergente: dois casos-controle não encontraram associação; um caso-controle

encontrou, em mulheres com genótipo TT e fumantes passivas do grupo pós-menopausa, associação com o aumento do risco de CM; e a meta-análise de um dos casos-controle associou o alelo C ao menor risco de CM.

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* analisaram o polimorfismo que apresentava o genótipo nulo, que implica na ausência da enzima glutationa S-transferase. Ambos os genes foram analisados por 9 artigos. Para *GSTM1*, apenas 1 artigo não encontrou associação significativa com o CM (em mexicanos). Já para o *GSTT1*, houve associação com o CM em 4 estudos.

Outros 323 genes foram encontrados, envolvendo mais de 1900 SNPs. O Quadro 3 faz um resumo dos genes com maior número de SNPs pesquisados e as suas respectivas associações ao CM:

Quadro 3 – Genes com maior número de SNPs relatados e associação com o risco de CM, em estudos de meta-análise e caso-controle

Gene (N de SNPs) N de artigos	Polimorfismos				
	Maior risco	Menor risco	Sem associação		
<i>ROR-a</i> (290 SNPs) 2 artigos	rs12914272 (1) rs1482057 (1)		Outros 288 SNPs estão listados na TS1 do artigo.		
<i>CYP19A1</i> (30 SNPs) 3 artigos	rs7176005 (1) rs11856927 (1) rs700518 (1)		rs6493497 (2) rs700519 (1) rs4646 (2) rs2414099 (1) rs2445762 (1) rs2470144 (1) rs8025191 (1) rs10459592 (1) (TTTA) <sub>n</sub> repeats (1)	rs2470152 (1) rs2470158 (1) rs2899472 (1) rs3751591 (1) rs4275794 (1) rs10046(2) rs12908960 (1) rs12591359 (1) rs17523880 (1)	rs17601876 (1) rs17703883 (1) rs1902584 (1) rs1961177 (1) rs7172156 (1) rs7174997 (1) rs727479 (1) rs730154 (1)
<i>CLOCK</i>	rs11932595 (1)*	rs3749474 (2)	rs17776421 (1)	rs10462028 (1)	rs13102385 (2)

(21 SNPs) 3 artigos			rs1048004 (2) rs11133389 (1) rs11133376 (1) rs10462032 (1) rs17085763 (1) rs3792603 (1)	rs1801260 (3) rs11133373 (2) rs3805151 (1) rs2035691 (1) rs6850524 (1) rs6554281 (1)	rs7698022 (3) rs17777927 (1) rs3805147 (1) rs11133391 (2) rs11932595 (1)*
<i>VEGF</i> (18 SNPs) 6 artigos	rs833061 (1)* rs699947 (2)* -2549 I/D (1) rs13207351 (1) rs1570360 (1) -634 G/C (2) rs3025039 (1)*	rs3025039 (2)* rs79469752 (1) rs28357093 (1)	rs3025039 (1)* rs2010963 (1) rs833061 (1)* rs35569394 (1)	rs59260042 (1) -7C/T (1) -160 C/T (1) -1498C/T (1) rs699947 (1)*	-1154G/A (1) +1612 G/A (1)
<i>CYP2C8</i> (18 SNPs) 1 artigo	rs11572172		rs10509681 rs1058930 rs1058932 rs11188147 rs11572126 rs11572127	rs1934952 rs1934953 rs1934954 rs1934980 rs1341163 rs1557044	rs3752988 rs6583967 rs6583968 rs7909236 rs1341164
<i>VDR</i> (17 SNPs) 8 artigos	rs7975232 (2)* rs1544410 (2)* rs2228570 (3)* KY859868 (1) rs731236 (2)*	rs2544038 (1) rs1544410 (1)* rs731236 (1)*	rs2071358 (1) rs2239181 (1) rs2239182 (1) rs2408876 (1) poly-A repeat (1)	rs11168287 (1) rs11168314 (1) rs1544410 (4)* rs10735810 (1) rs2228570 (1)*	rs3782905 (1) rs7299460 (1) rs7975232 (3)* rs10875694 (1) rs731236 (3)*
<i>CASP8</i> (16 SNPs) 7 artigos	rs2293554 (1) rs11899004 (1) rs3769825 (1) rs6723097 (1) rs6736233 (1)	rs1045485 (2)* rs3834129 (1)	rs12693932 (1) rs6745051 (1) rs11679181 (1)	rs13387042 (1) rs10931936 (1) rs700636 (1)	rs1861270 (1) rs1035140 (1) rs1045485 (2)*^

	rs1045494 (1) rs1045485 (1)*				
<i>LincRNAs</i> (16 SNPs) 1 artigo	rs12325489		rs2272901 rs532367 rs603092 rs17841343 rs4937447	rs3803662 rs10750417 rs10894115 rs1814343 rs1814344	rs4785367 rs2278016 rs3815784 rs1362378 rs10894116
<i>MGST3</i> (15 SNPs) 1 artigo	rs10918228		rs1878076 rs2297763 rs4147591 rs4147592 rs4147598	rs4147600 rs4147602 rs4626863 rs6657788 rs6690679	rs7527279 rs9333378 rs9333379 rs957644
<i>XRCC1</i> (12 SNPs) 6 artigos	rs25487 (5)*		rs25487 (1)* rs25489 (2) rs2682587 (1) rs2682585 (1)	rs3213255 (1) rs3213266 (1) rs1799782 (3) rs12611088 (1)	rs2682552 (1) rs939460 (1) rs2854496 (1) rs3213356 (1)
<i>CYP24A1</i> (11 SNPs) 2 artigos	rs4809957 (1) rs3787557 (1)	rs13038432 (1) rs6068816 (1)	rs6022999 (1) rs2181874 (1) rs927650 (1)	rs2244719 (1) rs2585428 (1) rs2762939 (1)	rs4809960 (1)
<i>IGF1</i> (11 SNPs) 3 artigos		rs1019731 (1) rs12821878 (1) rs17727841 (1) rs2288378 (1) rs7136446 (1) rs7956547 (1) CA repeat (1)	12q23.2-795399 (1) rs6214 (1) rs2195239 (1) rs1549593 (1)		
<i>ADH1B</i> (11 SNPs)	rs1789888		rs1042026 rs1159918	rs1229984 rs13133908	rs3811802 rs9307239

1 artigo			rs1229982 rs1229983	rs1353621 rs17033	
<i>NAT1</i> (11 SNPs) 1 artigo	rs8190871		rs11777998 rs15561 rs4921880 rs4986782	rs4986783 rs4986988 rs4986989 rs4986993	rs7003890 rs8190870
<i>NAT2</i> (11 SNPs) 1 artigo	rs1799929		rs1041983 rs1115784 rs1208 rs12674710	rs1799930 rs1799931 rs1801280 rs2410556	rs4646257 rs9987109
<i>CYB5R</i> (10 SNPs) 1 artigo	rs8190370		rs73888347 rs75133903 rs8190414	rs751153 ss159816065 ss159830807	rs76458556 ^ rs7284807 ^ rs111154229 ^
<i>microRNAs</i> (10 SNPs) 2 artigos	rs3134615 (1) rs4687554 (1) rs10719 (1) rs1052532 (1) rs1045494 (1)	rs1970801 (1)	rs1044129 (1) rs11169571 (1) rs1434536 (1) rs11097457 (1)		
<i>ADH1C</i> (10 SNPs) 1 artigo	rs1229980		rs11499823 rs11936869 rs1229980	rs1614972 rs1693482 rs1789895	rs1789921 rs283411 rs3846448
<i>CYP2E1</i> (10 SNPs) 1 artigo	rs743535		rs2031920 rs2070674 rs3813867	rs6413419 rs6413420 rs6413421	rs8192772 rs915908 rs9418990
<i>GSTA4</i> (10 SNPs) 1 artigo	rs3756980		rs13197674 rs16883343 rs17615213	rs316129 rs1802061 rs2274760	rs367836 rs378775 rs7496
<i>PARP2</i> (10 SNPs)	rs878157		rs7159947 rs2297616	rs1760920 rs3093904	rs878156 rs3093939

1 artigo			rs1760921	rs3093921	rs3093942
<i>MGST1</i>	rs4149197		rs1024839	rs3815566	rs4149208
(10 SNPs)			rs1828682	rs3844373	rs9332908
1 artigo			rs2075237	rs4149205	rs9332952
<p>Legenda:</p> <p>(n) número de artigos</p> <p>* SNP com mais de um resultado associativo</p> <p>^ excluído das análises estatísticas ou não detectado na população do estudo</p> <p>TS1 Tabela suplementar 1</p>					

Apesar das divergências nos resultados em relação a associação dos polimorfismos com o risco de CM, o grande número de estudos com resultados significativos, muitos concordantes, aponta para a possibilidade de determinação de perfis genéticos associados ao risco aumentado de CM, o que pode ser potencializado pela realização de mais estudos dessa natureza. Os resultados conflitantes mostram a importância dos estudos com SNPs, indicando a necessidade de considerar quesitos como etnia e fatores que interferem nas vias que envolvem os respectivos genes para a adequada interpretação dos resultados.

#### 4.1.1. Polimorfismos da telomerase associados ao risco de câncer de mama

Em relação a telomerase, dois artigos abordaram o gene, envolvendo a análise de 2 polimorfismos, um em cada artigo: rs2736098, que foi associado ao risco de CM numa população do Irã (genótipo GG: OR= 3,17,  $p < 0,01$ ), e o rs10069690, sem associação significativa em uma população de ascendência europeia (OR= 1,05,  $p = 0,089$ ).

Uma meta-análise encontrou o mesmo resultado, associação com o risco de CM, para o SNP rs2736098 em três populações, turca (OR= 1,88, IC 95% 1,04-3,40 e  $p = 0,034$ ), polaca (OR= 0,76, IC 95% 0,58-1,00 e  $p = 0,05$ ) e iraniana (OR= 1,87, IC 95% 1,19-2,94 e  $p = 0,006$ ) (25).

Já o SNP rs10069690, na mesma meta-análise, teve associação contrária ao do achado na revisão: houve associação com o risco de CM na população branca

não-hispânica dos EUA e na população hispânica e mexicana dos EUA (OR = 1,13, IC 95% 1,03-1,24) e associação ao risco aumentando de CM RE negativo (OR=1,18, IC95% 1,13-1,25,  $p=1 \times 10^{-10}$ ) (25).

A baixa frequência de estudos para este gene nessa revisão e a sua importância pela relação com a via carcinogênica, revelam a necessidade de mais estudos com os polimorfismos do gene *hTERT*.

Ao final da revisão sobre esses polimorfismos, os dados foram compilados em um artigo, submetido à revista Breast Cancer Research and Treatment – Qualis A2 (Anexo G).

## 5. CAPÍTULO 2

### 5.1. POLIMORFISMOS DA TELOMERASE COMO FATOR DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA

Para o estudo do fator de risco para CM numa população do DF, após seleção da região com melhor qualidade de sequenciamento, foi analisado os polimorfismos possíveis de análise técnica, que apresentaram qualidade mínima de eletrogerograma e sequencia confiável. Oito polimorfismos de interesse foram identificados: rs2242652, rs964200877, rs540807196, rs980822475, rs10078991, rs1054221410, rs930389112 e rs1433143099. Esses polimorfismos estão localizados no braço curto do cromossomo 5, na posição 13.38 (5p13.38) – Figura 5.

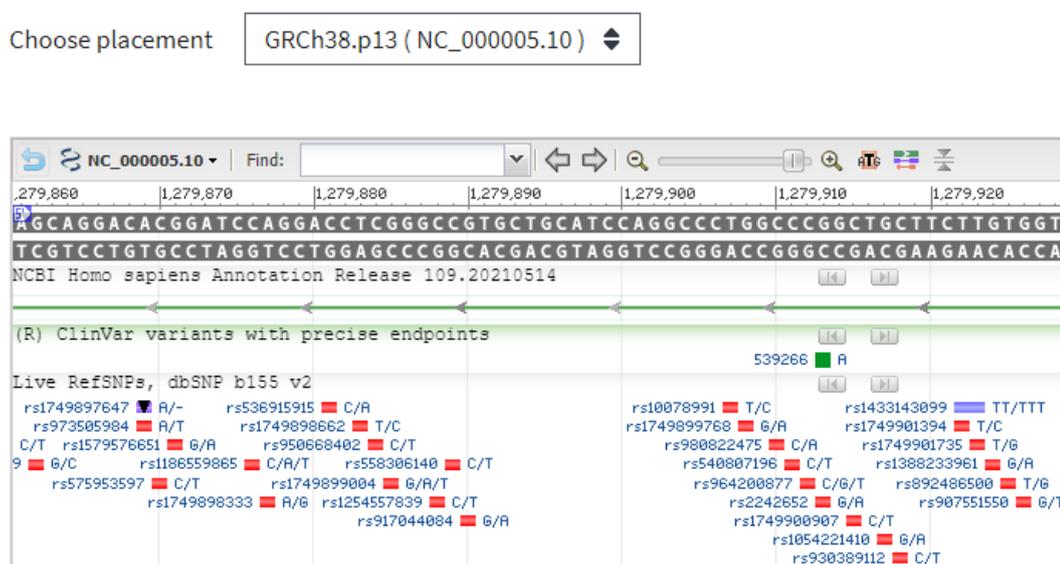


Figura 5 – Posição dos polimorfismos

#### 5.1.1. Caracterização dos grupos

Os pacientes do CETTRO que aceitaram participar da pesquisa compuseram o grupo caso. O banco de dados desse grupo possui o registro de 167 pacientes com CM. Desses, 16 foram excluídos nas análises por falta de qualquer dado clínico. Portanto, há dados clínicos de 151 pacientes com diagnóstico de CM. 99,33% dessa amostra é do sexo feminino (apenas 1 do sexo masculino). Outros dados clínicos do

grupo serão discutidos com mais detalhes no tópico 4.3 (Características gerais do grupo caso).

Os doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília que aceitaram participar do projeto formaram o grupo controle. Cento e noventa e oito indivíduos aceitaram participar da pesquisa, sendo 62,12% doadores do sexo feminino. Sete amostras foram excluídas da pesquisa, por determinação do Hemocentro, perda da amostra ou preenchimento errôneo do TCLE. A média da idade dos participantes foi de 46,82 anos, e a mediana foi 45. A altura média foi 1,66m e a média do peso, 76,97kg.

Outros dados coletados sobre o grupo controle abordam o histórico de câncer na família. Oitenta e três indivíduos relataram não ter histórico de câncer. A Figura 6 mostra os tipos de câncer relatados pelos indivíduos que apresentaram histórico de câncer. O CM foi o mais relatado, seguido de próstata, pulmão e intestino. Para 38 casos não houve relato do tipo de câncer.

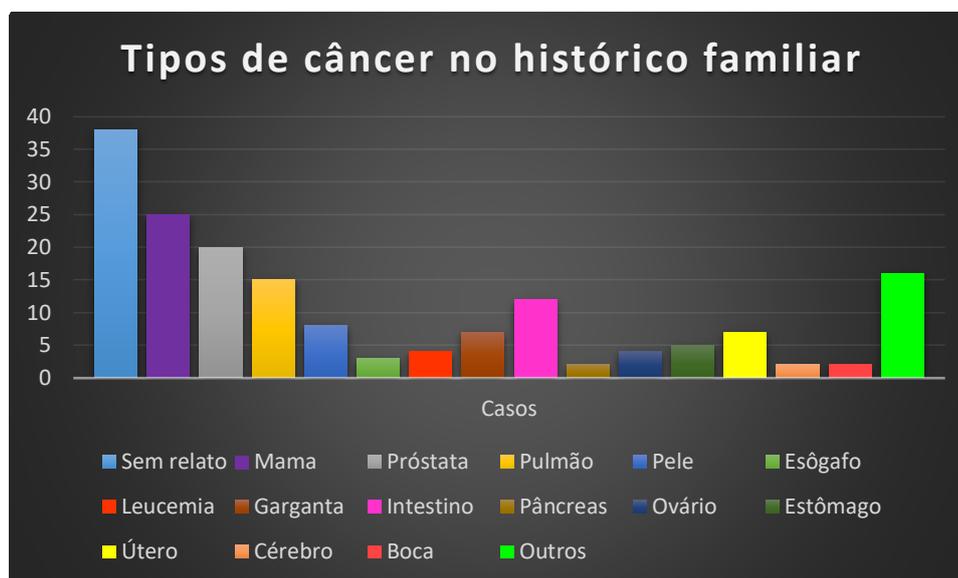


Figura 6 – Tipos de câncer relatados no histórico familiar do grupo controle

Legenda: Outros: tipos de câncer com apenas 1 relato de caso

Para aqueles que apresentaram histórico de câncer familiar, foi perguntado o grau de parentesco e tipo de câncer. Sobre os familiares, a Tabela 2 mostra o grau de parentesco relatado para o histórico de câncer familiar. O maior relato de casos de histórico de câncer foi para os tios, seguido dos avós.

Tabela 2 – Grau de parentesco para o histórico de câncer familiar

Grau de parentesco	Casos de câncer
Pai	34
Mãe	23
Avós	35
Bisavós	1
Tios	46
Irmãos	12
Primos	12
Sobrinhos	1
Não relatado	9

A análise do sequenciamento resultou em 108 indivíduos para o grupo caso e 108 para o grupo controle. A Tabela 3 mostra a comparação da distribuição de dados básicos sobre esses indivíduos dos dois grupos. Através desses dados, é possível notar que os grupos são comparáveis, o que permite uma análise confiável de associação entre os grupos. Nos dois próximos tópicos serão descritos os resultados das análises do sequenciamento para cada grupo, e em seguida, a análise do fator de risco.

Tabela 3 – Comparação da distribuição dos grupos caso e controle que participaram da análise de fator de risco

Variável	CASO			CONTROLE		
	Resultado	Valores		Resultado	Valores	
		Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo
Peso (kg)	65,85*	43,7	124	71*	52	128
Idade (anos)	50*^	28	82	44*	32	86
Altura (m)	1,58*	1,44	1,81	1,62*	1,50	1,80
IMC	26,14*	15,85	48,43	27,39*	19,46	39,95
Masculino	1	-	-	4	-	-
Feminino	107	-	-	104	-	-

Legenda: \*Mediana; ^ idade no momento do diagnóstico

### 5.1.2. Polimorfismos no grupo caso

Após o sequenciamento, foi separado o eletroferograma de 115 amostras de pacientes com CM – Figura 7. Ao fazer a leitura dos eletroferogramas, algumas

amostras foram excluídas por apresentar um sequenciamento de baixa qualidade nas regiões analisadas, resultando na análise de 108 pacientes – Quadro 4.

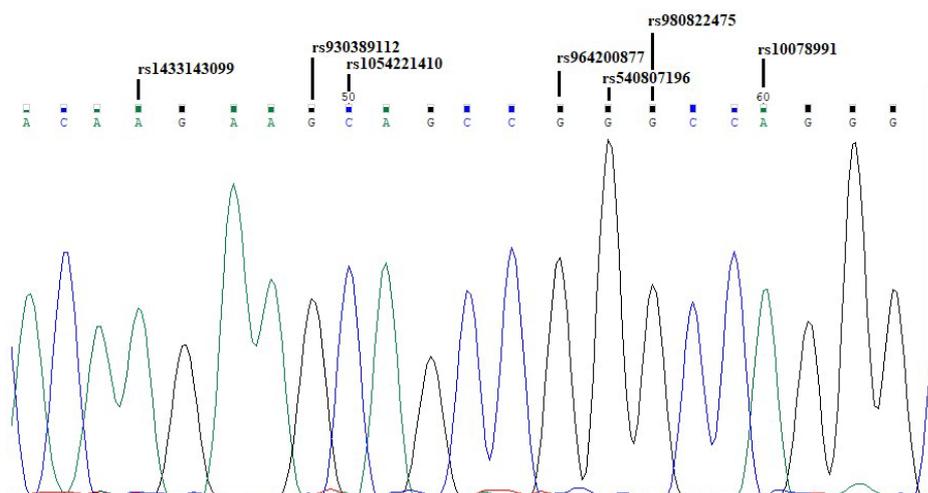


Figura 7 – Eletroferograma com os polimorfismos analisados (Caso)

Uma parte dos polimorfismos, 42,85%, não apresentaram nenhuma variabilidade (rs964200877, rs1054221410 e rs930389112) e o polimorfismo rs980822475 só apresentou um genótipo diferente. Houve 4 casos de adição para o polimorfismo rs1433143099. O polimorfismo que apresentou uma maior variação gênica foi o rs10078991, apresentando 4 genótipos, sendo o TT o mais frequente. O estudo desses polimorfismos é recente, não sendo encontrado publicações sobre eles em bases como NCBI, Scopus, Web of Science, Portal Periódicos, Scielo e Google Scholar. A única informação disponível é sobre a região gênica, no banco dbSNP (NCBI).

Quadro 4 – Genótipo e frequência alélica dos polimorfismos no grupo caso

Polimorfismo	Genótipo			Frequência Alélica		
	Genótipo	Casos/ Total	Frequência	Alelo	Casos/ Total	Frequência
rs2242652	AA	3/107	2,80%	A	30/214	14,02%
	GA	24/107	22,43		G	184/214
	GG	80/107	74,77%			
rs964200877	CC	105/105	100%	C		210/210
rs540807196	CC	101/102	99,02%	C	203/204	99,51%

	CT	01/102	0,98%	T	1/204	0,49%
rs980822475	CC	92/98	93,88%	C	190/196	96,94%
	CT	6/98	6,12%	T	6/196	3,06%
rs10078991	TT	81/100	81%	T	177/200	88,50%
	TC	15/100	15%	C	22/200	11%
	CC	3/100	3%	A	1/200	0,5%
	CA	1/100	1%			
rs1054221410	GG	108/108	100%	G	216/216	100%
rs930389112	CC	107/107	100%	C	214/214	100%
rs1433143099	TT	97/101	96,04 %	T	206/206	101,98%
	TTT	4/101	3,96%			

### 5.1.3. Polimorfismos no grupo controle

Para a determinação do fator de risco, as amostras dos grupos caso e controle precisavam ser pareadas, portanto deu-se a preferência pelo sequenciamento de amostras do grupo controle do sexo feminino. A análise do eletroferograma foi realizada para 124 sequenciamentos. Ao final, foi obtido o resultado do sequenciamento de 108 indivíduos saudáveis, sendo 4 homens e 104 mulheres – Figura 8. O Quadro 5 mostra a distribuição do genótipo e do alelo por polimorfismo.

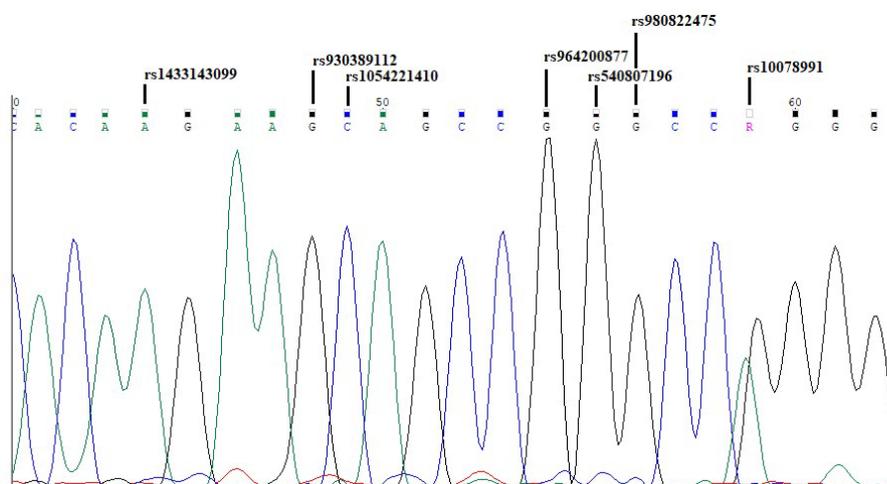


Figura 8 – Eletroferograma com os polimorfismos analisados (Controle)

A maioria dos polimorfismos mostrou pouca variabilidade, sendo 4 polimorfismos com uma variabilidade de genótipo de até 3% (rs980822475,

rs1054221410, rs930389112 e rs1433143099) e 2 polimorfismos com apenas um genótipo (rs964200877 e rs540807196). Apenas 2 polimorfismos apresentaram uma maior frequência de variação de genótipo e alelo, rs10078991, com 12,38% para o genótipo menos frequente (genótipo TC) e 6,19% para o alelo menos frequente (alelo C); e o rs2242652, que apresentou três genótipos, com 2,78% para o genótipo menos frequente (genótipo AA) e 17,59% para o alelo menos frequente (alelo A).

Quadro 5 – Genótipo e frequência alélica dos polimorfismos no grupo controle

Polimorfismo	Genótipo			Frequência Alélica		
	Genótipo	Casos/ Total	Frequência	Alelo	Casos/ Total	Frequência
rs2242652	AA	3/108	2,78%	A	38/216	17,59%
	GA	32/108	29,63%			
	GG	73/108	67,59%	G	178/216	82,41%
rs964200877	CC	106/106	100%	C	212/212	100%
rs540807196	CC	106/106	100%	C	212/212	100%
rs980822475	CC	104/106	98,11%	C	210/212	99,06%
	CT	2/106	1,89%	T	2/212	0,94%
rs10078991	TT	92/105	87,62%	T	197/210	93,81%
	TC	13/105	12,38%	C	13/210	6,19%
rs1054221410	GG	103/104	99,04%	G	207/208	99,52%
	GT	1/104	0,96%	T	1/208	0,48%
rs930389112	CC	104/105	99,05%	C	209/210	99,52%
	CT	1/105	0,95%	T	1/210	0,48%
rs1433143099	TT	98/101	97,03%	T	205/205	101,49%
	TTT	3/101	2,97%			

#### 5.1.4. Determinação do fator de risco para câncer de mama

Para a determinação do fator de risco para o CM, a associação dos polimorfismos dos grupos caso e controle foram calculados pelo Risco Relativo (RR) e teste de Fisher. Para o RR, o valor acima de 1 indica risco de desenvolver a doença, e valores menores que 1 indicam efeito de redução de risco. Para que esse resultado

seja válido, é considerado o valor de p através do teste de Fisher. Os resultados dessas análises são apresentados na Tabela 4.

O polimorfismo rs980822475 não foi estatisticamente significativo ( $p= 0,16$ ), mas o seu valor de p foi próximo ao valor significativo, demonstrando uma tendência de resultado que pode se tornar significativo com o aumento da amostra. O polimorfismo rs10078991 (presença do alelo T) também não foi significativo, mas teve o valor de p muito baixo,  $p= 0,06$  – valor arredondado ( $p=0,55$ ). Os outros polimorfismos não foram significativos.

Tabela 4 – Fator de Risco para polimorfismos do gene *hTERT*

Polimorfismo	Associação com câncer de mama		
	Risco Relativo*	IC95%	p (Fisher)
rs2242652	1,2	0,89-1,69	0,29
rs964200877	1	0,97-1,04	0,99
rs540807196	1,01	0,97-1,82	0,49
rs980822475	1,04	0,97-1,13	0,16
rs10078991**	1,08	0,96-1,23	0,25
rs10078991***	<b>1,04</b>	<b>1,004-1,042</b>	<b>0,06</b>
rs1054221410	0,99	0,95-1,03	0,49
rs930389112	0,99	0,95-1,03	0,49
rs1433143099	1,01	0,95-1,08	0,99

\* Em relação ao genótipo menos frequente

\*\* Presença do alelo C

\*\*\* Presença do alelo T

A análise do SNP rs10078991, que considera a presença do alelo T em relação ao genótipo menos frequente [genótipo TT e TC x CA e CC], apresenta um efeito pequeno, com o RR baixo, porém está acima de 1 (RR= 1,004). Isso demonstra 1,004 vezes mais risco de desenvolver o CM para quem tem o genótipo menos frequente (genótipos CC e CA) – ou seja, quem não apresenta o alelo T tem 1,004 vezes mais risco de desenvolver CM. Aumentando o número amostral pode ser que aumente a significância e o RR. Em conjunto com outras características gênicas, este SNP pode implicar em um risco maior de CM, e por isso pode ser utilizado em um painel de genes para detecção precoce de CM ou para fator de risco de CM.

Outra observação sobre a análise desse SNP (rs10078991) é que quando foi feita a associação entre a variante principal (a mais frequente, genótipo TT) em

relação as outras (genótipos TC, CC e CA;  $p=0,25$ ), não foi encontrado um fator de risco aumentando de CM em relação ao genótipo TT. Complementando com o resultado descrito acima, isso reafirma que quando se compara quem tem o alelo T com quem não tem o alelo T, aqueles que não tem o alelo T possuem um fator de risco, ainda que pequeno, mas é um fator de risco para CM. Portanto, ter pelo menos um alelo T é um fator de proteção para CM.

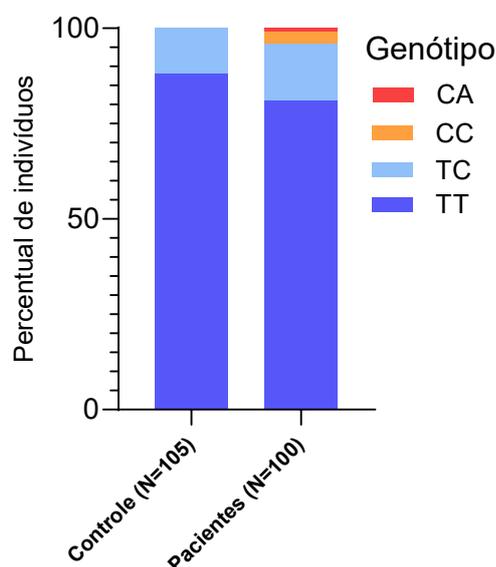


Figura 9 – Distribuição de casos por genótipo para os grupos caso e controle para o polimorfismo rs10078991

A Figura 9 mostra a distribuição das variantes para o polimorfismo rs10078991. O grupo controle apresenta menos variantes, tendo em seu grupo apenas os genótipos TT e TC. Já no grupo caso, os pacientes com CM apresentam mais variantes, inclusive com a ausência do alelo T (genótipos CA e CC), refletindo a influência do alelo T como fator de proteção para o CM e a sua ausência como risco para o CM ( $RR= 1,004$ ,  $IC95\%= 1,004-1,042$ ,  $p= 0,06$ ). Portanto, é possível que com o aumento das amostras a associação pode ser mais significativa.

Além da possibilidade de usar esse SNP em painéis de análise de risco de CM, é importante considerar como esse resultado pode influenciar o estudo da biologia do câncer: mesmo que clinicamente a associação não tenha grande impacto, por ser uma associação pequena, o fato de ter uma associação acende um alerta para estudos futuros sobre a implicação dessa região gênica na carcinogênese do CM.

A nível molecular, a maior variedade de genótipos no grupo caso demonstra uma instabilidade genética nessa região, o que condiz com a natureza da carcinogênese. Por ser tratar da região promotora da telomerase e, portanto, mais susceptível a múltiplas cópias, há mais chances de inclusão de novas mutações e, conseqüentemente, mais polimorfismos. Como já foi mencionado, mutações na região codificante do gene hTERT podem afetar a atividade da telomerase e gerar fenótipos clínicos graves, como um aumento na frequência do câncer (48). A subunidade catalítica da telomerase pode ter sua atividade aumentada por conta de mutações na região promotora do gene, o que é importante para a imortalização e carcinogênese (56). No câncer de tireoide, por exemplo, mutações na região promotora são preditoras de pior prognóstico e são associadas ao comportamento clínico agressivo (maior tamanho do tumor, estágio tumoral avançado, metástases e morte específica pela doença) (56). Um estudo com uma população do Oriente Médio encontrou associações significativas para fatores prognósticos ao comparar pacientes com câncer de tireoide que tiveram mutações na região promotora com aqueles que não tiveram mutações nessa região: o grupo que apresentou mutações no promotor TERT apresentou maior tamanho do tumor ( $4,75 \pm 2,6$  cm vs  $3,2 \pm 2,2$  cm,  $P < 0,0001$ ), invasão vascular mais frequente (56,2% vs 30,8%,  $P = 0,009$ ), maior estágio TNM (estágio III e IV) (53,3% vs 15,9%,  $P < 0,0001$ ) e doença persistente/recorrente mais comum em 6-12 meses após a ablação remanescente da radioiodo (71,4% vs 50,7%,  $P = 0,045$ ) (57). Novas pesquisas podem analisar a influência da variação dos genótipos sobre as alterações que podem provocar na própria proteína ou na expressão dela e, assim, determinar a relevância no padrão da telomerase ou da sua expressão na história do desenvolvimento da doença.

Considerando que a análise de fatores prognósticos também tem sua contribuição na pesquisa do câncer, por termos a disposição os dados clínicos e variáveis clínicas que indicam prognóstico, acrescentaria muito à nossa pesquisa estudar as associações prognósticas com os polimorfismos para averiguar a influência dessas variáveis no histórico da doença. Mas antes, para melhor entendimento do significado desses fatores, é importante conhecer as características do grupo, a distribuição dessas variáveis e o significado clínico delas, o que se faz no próximo tópico.

## 5.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO CASO

As análises a seguir são referentes aos dados clínicos de 151 pacientes com diagnóstico de CM.

### 5.2.1. Câncer de mama e fatores prognósticos

Os dados descritivos dos pacientes com CM estão na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados gerais dos pacientes com câncer de mama

Variável	Casos	Descrição
Peso	145	Mediana: 66 kg
Altura	143	Mediana: 1,58 m
IMC	143	Mediana: 26,33
Idade ao Diagnóstico	151	Mediana: 50 anos
CDIS associado	65	Sim: 61,54% (40)
		Não: 38,46% (25)
Multifocalidade	61	Sim: 27,87% (17)
		Não: 72,13% (44)
Invasão angiolinfática	70	Sim: 50% (35)
		Não: 50% (35)
Invasão perineural	55	Sim: 40% (22)
		Não: 60% (33)
Infiltrado inflamatório	47	Sim: 46,81% (22)
		Não: 53,19% (25)
Necrose tumoral	58	Sim: 46,55% (27)
		Não: 53,45% (31)
Linfonodos acometidos	89	Mediana: 1
Imunohistoquímica		
RE	133	RE negativo: 23,30% (31)
		RE positivo: 76,70% (102)
RP	132	RP negativo: 30,30% (40)
		RP positivo: 69,70% (92)
HER2	130	HER2 negativo: 73,08% (95)
		HER2 positivo: 26,92% (35)
Ki67	117	Mediana: 25

Legenda: Sim: presença da variável; Não: ausência da variável

A média da idade no momento do diagnóstico (idade ao diagnóstico) foi de 50 anos, sendo a menor idade a de 28 e a maior a de 82. A amostra se encontra bem

caracterizada em relação a idade ao diagnóstico, que é um risco importante no CM (58). Como o envelhecimento está relacionado às causas do câncer (5), é esperado que a maioria dos casos ocorram em faixas etárias maiores, como na amostra de estudo: 66% tem mais de 45 anos. Dos 50 restantes, 38% tem menos de 35 anos. Apesar da maioria pertencer a uma faixa etária maior, há uma quantidade considerável de casos em faixas etárias mais novas. Isso mostra a relevância da busca por marcadores que identifiquem precocemente o câncer, já que a doença pode se desenvolver em qualquer faixa etária.

O diagnóstico precoce é importante pois confere também um melhor prognóstico para qualquer faixa etária. Parte do sucesso da redução da mortalidade por câncer está relacionado ao desenvolvimento de programas de detecção e prevenção precoce, que detecta potencialmente o tumor em um estágio inicial ou pré-invasivo (22). Esses marcadores podem detectar o câncer precocemente em indivíduos assintomáticos, diagnosticar doenças em amostras de tecidos e avaliar a resposta ao tratamento (23). Além da detecção, há casos em que o uso de marcadores tem sido utilizado para tomar medidas profiláticas: a cirurgia preventiva, que implica na remoção profilática de um órgão ou lesão com alto risco de transformação maligna em indivíduos com predisposição ao câncer, é utilizada em casos que há a mutação no *BRCA1* ou *BRCA2*, reduzindo o risco de câncer de mama e ovário em mais de 90% (22). Portanto, é clara a utilidade do uso de marcadores para a detecção e tratamento da doença, principalmente em relação a melhora do prognóstico nos casos de detecção precoce.

Dentre os fatores ligados a carcinogênese, o índice de massa corporal (IMC) é relevante pois pode influenciar diversos parâmetros. Na amostra, a média do IMC foi de 27 (peso médio de 69 kg e a altura média de 1,59m). O sobrepeso está presente na maioria dos pacientes (63,64%), o que também pode influenciar no prognóstico (59). O sobrepeso está associado ao risco para diversos tipos de câncer, por estar relacionado a mecanismos que promovem mutações e crescimento de células modificadas (60). Além de poder estar relacionado a causa do câncer, o IMC de 27 (sobrepeso) confere a amostra um fator de risco ao mau prognóstico, ao se considerar que a obesidade afeta a detecção, diagnóstico e resposta ao tratamento do câncer e a sobrevivência (59). Estudos com pacientes obesos que retornam ao peso corporal normal sugeriram que a perda de peso pode diminuir as taxas de recorrência do

câncer, em pacientes com câncer de mama e de próstata (59), mostrando que a perda de peso pode auxiliar em relação ao prognóstico.

Os fatores preditivos clínicos e patológicos, bem como os fatores prognósticos, são utilizados para determinar o tratamento no CM. Grau histológico, status do linfonodo, tamanho do tumor, métodos moleculares e padrão de crescimento fornecem informações prognósticas complementares e determinam o melhor tratamento para o paciente (61). Sendo assim, CDIS associado, multifocalidade, invasão angiolinfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório, necrose tumoral, linfonodos acometidos e imunohistoquímica são dados importantes para determinar o prognóstico e auxiliar na escolha do tratamento.

Considerando as características moleculares, o câncer de mama é classificado quanto a presença ou ausência de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e receptor de crescimento epidérmico do tipo 2 (HER2) (62), e a expressão de Ki67 auxilia nessa classificação – Tabela 6. O Ki67, uma proteína nuclear expressa nas células durante as fases de crescimento e mitose, está relacionado a capacidade proliferativa das células tumorais e a sua expressão elevada está associada a um pior prognóstico (18).

Tabela 6 - Classificação imunohistoquímica

Classificação	RE	RP	HER2	Ki67
Luminal A	+	+	-	<14%
Luminal B	+ e/ou +		+ ou -	=14%
HER2 enriquecido	-	-	+	
Triplo negativo (tipo basal)	-	-	-	

Fonte: Adaptado de (18,62,63)

Na Figura 10 está a classificação da amostra dos pacientes com CM quanto a imunohistoquímica. O tipo Luminal é associado a prognósticos mais favoráveis, enquanto o triplo negativo e o HER2 negativo a prognósticos mais reservados – sendo que o triplo negativo apresenta maior risco de recorrência (em 3 anos) e maior taxa de mortalidade (em 5 anos) (63). Considerando os dados imunohistoquímicos (Tabela 6 e Figura 10), a maioria apresenta prognóstico favorável: mais casos de Luminal e Triplo Positivo, além de RE e RP positivos na maior parte da amostra.

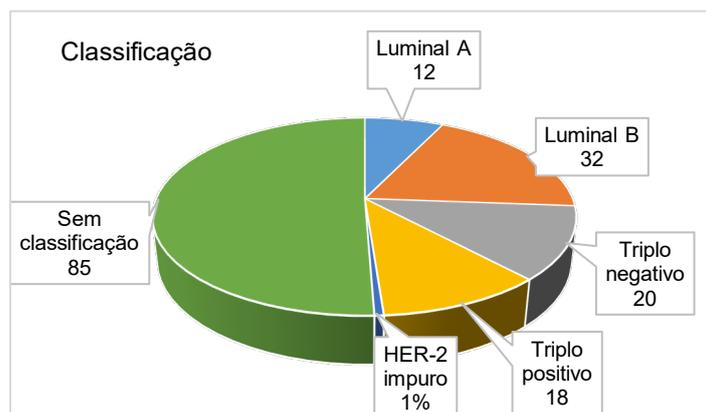


Figura 10 – Classificação quanto a imunohistoquímica

A classificação TNM objetiva o estadiamento do câncer para descrever a extensão anatômica da doença antes de se tomar medidas terapêuticas. Para a classificação, é considerando o tamanho e/ou extensão do tumor (T), o envolvimento de linfonodos regionais (N) e metástases (M) (64). Para o CM, o significado para a classificação TNM (Quadro 6) e o grupamento por estágio (Tabela 7) estão descritos a seguir.

Quadro 6 – Significado TNM para o CM

TNM	Significado	Resumo esquemático
T – Tamanho do tumor		
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão	≤ 2 cm
T2	Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão	> 2 cm até 5 cm
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão	> 5 cm
T4	Tumor de tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele	Parede torácica/pele
N – Linfonodos regionais		
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais	Sem comprometimento de linfonodos
N1	Metástase em linfonodo axilar, homolateral, móvel	Micrometástase, > 0,2 mm ≤ 2 mm; 1-3 linfonodos axilares; Linfonodos mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente;

		1-3 linfonodos axilares e mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente.
N2	Metástase em linfonodo axilar homolateral fixo ou metástase clinicamente aparente em linfonodo mamário interno homolateral, na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo axilar	4-9 linfonodos axilares; Ou em linfonodos mamários internos homolaterais, clinicamente aparentes, sem metástase em linfonodos axilares.
N3	Metástase em linfonodo infraclavicular homolateral com ou sem envolvimento de linfonodo axilar; ou clinicamente aparente em linfonodo mamário interno homolateral, na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo axilar; ou metástase em linfonodo supraclavicular homolateral com ou sem envolvimento de linfonodo axilar ou mamário interno	≥10 linfonodos axilares ou infraclaviculares; Linfonodos mamários internos, clinicamente aparentes, com linfonodo axilar ou >3 linfonodos axilares e mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente; Linfonodos supraclaviculares.
M – Metástase a distância		
M0	Ausência de metástase	Sem metástase à distância
M1	Metástase à distância	Presença de metástase à distância

Fonte: (65)

A categorização através do TNM pode ser combinada aos grupos de Estádio I, II, III e IV. Tumores em estágio I estão localizados no órgão de origem, e tumores em estágio IV apresentam metástase (64), indicando um tumor mais agressivo.

Tabela 7 - Grupamento por estágio para o CM

Estádio	T	N	M
I	T1	N0	M0
	T0	N1	M0
IIA	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
IIIB	T3	N1,N2	M0
	T4	N0,N1,N2	M0
IIIC	Qualquer T	N3	M0

IV	Qualquer T	Qualquer N	M1
----	------------	------------	----

Fonte: (65)

A classificação TNM dos pacientes com CM está descrito na Figura 11. Através da Figura 11 constatamos que mais da metade da amostra possui um tumor com mais de 2cm: 64,29% dos casos com T2 e T3. Em relação aos linfonodos, 53% não apresentaram comprometimento do linfonodo regional, o que é bom para o prognóstico. 47% apresentaram alguma metástase no linfonodo. A metástase a distância foi identificada em apenas 5,8% dos casos.

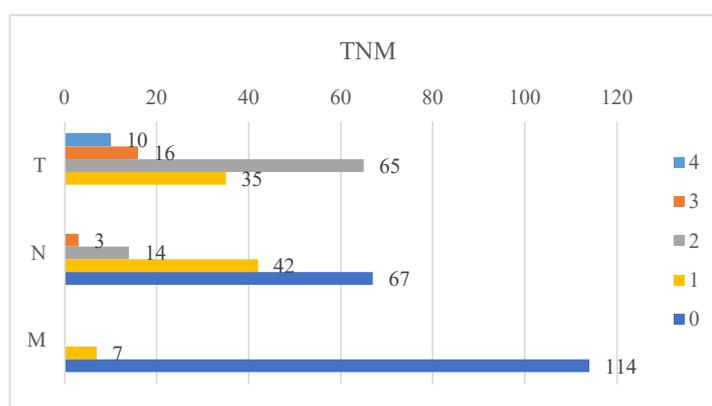


Figura 11 – Casos quanto a classificação TNM

O estadiamento, tipo e grau do tumor estão descritos no Quadro 7:

Quadro 7 – Estadiamento, tipo e grau do tumor

Estadiamento	Casos	Tipo	Casos	Grau	Casos
I	12	CDI	116	0	2
IA	5	CDIS	2	1	12
IB	1	CDI e mucinoso	1	2	63
II	3	CLI	7	3	36
IIA	23	CDI e CLI	1		
IIB	19	Carcinoma intraductal não infiltrante SOE	1		
III	1	Carcinoma micropapilífero invasivo da mama	1		
IIIA	8	Carcinoma medular	1		
IIIB	8	Sem TU	1		
IV	5				

A maior parte da amostra apresenta estadiamento II, indicando tumores de tamanho intermediário (T0 a T3), linfonodos livres ou com axilares móveis (N0 a N1) e sem metástase (M0) (65), considerado portanto tumores de estágio inicial ou avançado localmente (66).

O tipo histológico está relacionado ao local e padrão de crescimento do tumor. Há grande diversidade no CM, que apresenta padrões morfológicos e citológicos específicos com aspectos clínicos e resultados distintos (18,67). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece pelo menos 17 diferentes tipos histológicos (67), sendo os mais comuns o CDI e o CLI, que representam cerca de 90% dos tumores de mama (19). Os casos mais comuns na amostram estão em conformidade com a literatura, CDI e CLI.

Quanto ao grau histológico, 87,6% dos casos estão classificados como grau 2 e 3. O grau histológico analisa a diferenciação do tecido tumoral, onde se avalia as características morfológicas (diferenciação e atividade proliferativa) que refletem a sua agressividade (61,67). Atualmente, usa-se o sistema de classificação de Nottingham (Quadro 8).

A classificação do grau de Nottingham é determinada pela soma dos escores (68):

- Grau 1: 3 a 5 escores
- Grau 2: 6 a 7 escores
- Grau 3: 8 a 9 escores

Quadro 8 – Escores para avaliação dos critérios do sistema de classificação Nottingham

Critérios	Descrição	Escore
Grau Tubular	Formação tubular presente em:	
	Mais de 75% do tumor	1
	10 a 75% do tumor	2
	Menos de 10% do tumor	3
Grau Nuclear	Leve atipia nuclear: núcleos pequenos regulares e uniformes	1
	Moderada atipia nuclear: tamanho moderado e variabilidade	2
	Intensa atipia nuclear: variabilidade marcante e presença de nucléolos	3

Índice Mitótico*	0 a 5 mitoses por campo de grande aumento	1
	6 a 10 mitoses por campo de grande aumento	2
	Mais que 11 mitoses por campo de grande aumento	3

Legenda: \*Para microscópio Nikon (diâmetro de campo de 0,44mm e objetiva de 40x)

Fonte: Adaptado de (68)

Os cânceres de alto grau estão relacionados a maior recorrência e metástase. Já os de baixo grau tendem a apresentar um bom prognóstico e os de grau 2 mostram um resultado intermediário nos primeiros anos de acompanhamento, mas com uma tendência de recorrência a longo prazo (61). Portanto, a maioria dos casos do estudo demonstram uma tendência a recorrência. Para confirmar este parâmetro os pacientes precisariam ser acompanhados por um período maior.

Para a análise estatística dos dados clínicos foi realizada uma análise exploratória para verificar possíveis associações. Para a classificação do IMC foi denominado IMC normal como menor que 25 (n= 52) e IMC alto como igual ou acima de 25 (n= 91). Na categoria Idade ao diagnóstico, que considera a idade no momento do diagnóstico, foi considerada a mediana para o CM: Jovem (n= 28) e Normal (n= 123). Já para o Ki67 foi estabelecida a mediana e removida 17 amostras, entre o percentil 40 e 60; assim, considerou-se Ki67 Baixo para valores  $\leq 20$  e alto para  $\geq 30$ .

A Figura 12 mostra as associações com o HER2. A expressão de HER2 está associado ao CM mais agressivo (69). Observamos isso no estudo ao conferir que o HER2 positivo está associado a outros indicadores de mau prognóstico: é maior no grupo que apresenta multifocalidade (Fig. 12A) e Ki67 alto (Fig. 12D) (62).

O CDIS associado pode conferir um mau prognóstico por ser uma lesão precursora (66) frequentemente associada a doença residual e recorrência local (70). Apesar do valor de p não ter dado significativo para o CDIS associado (Fig. 12B,  $p=0,08$ ), este valor está próximo de 0,05 e é visível a maior frequência do HER2 positivo no grupo com o CDIS associado. Outros estudos relataram a frequência do HER2 positivo no CDIS (71,72). Apesar de uma possível relação com mau prognóstico, esta associação pode auxiliar em questão de tratamento, por proporcionar o uso de inibidores do HER2, como o trastuzumabe (66,73).

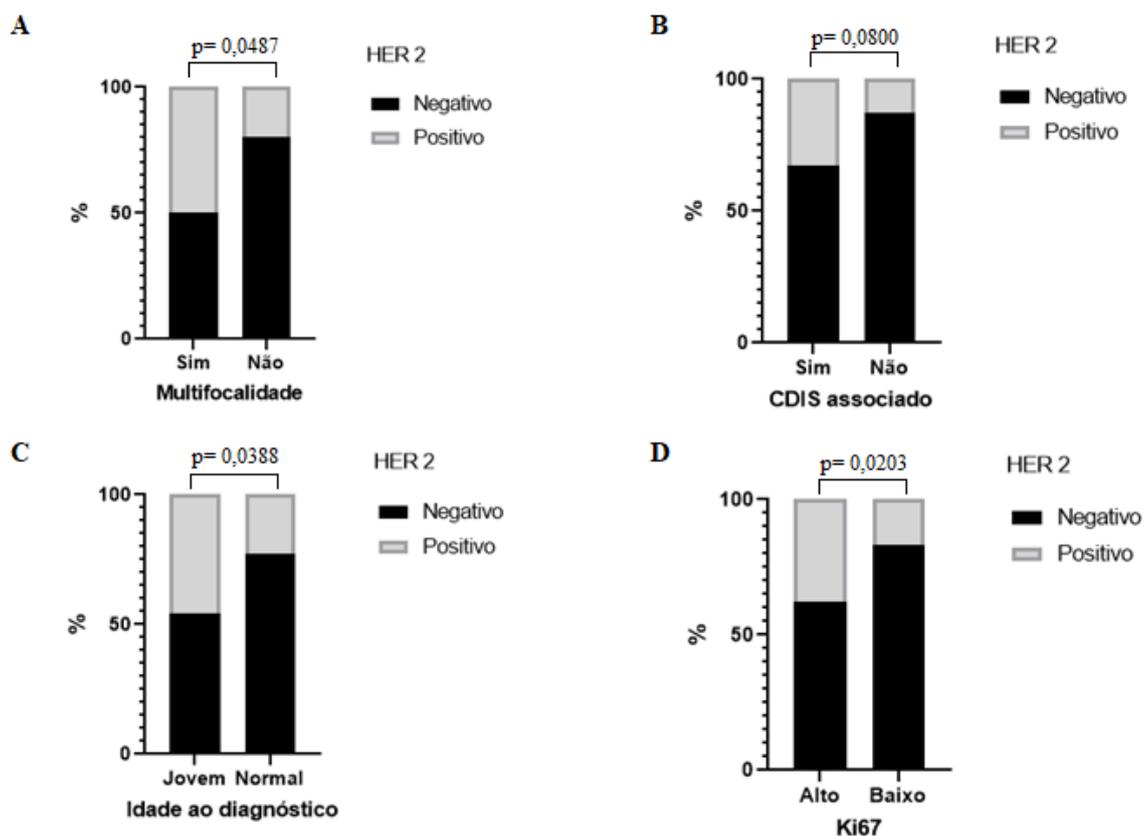


Figura 12 – Variáveis associadas a HER2 positivo ou negativo. **A** – Multifocalidade (n= 60 e Teste de Fisher). **B** – CDIS (n= 63 e Teste de Fisher). **C** – Idade ao diagnóstico (n= 130 e Teste de Fisher). **D** – Ki67 (n= 114 e Teste de Fisher).

Em relação a idade ao diagnóstico (Fig. 12C), o HER2 positivo foi associado ao grupo com a faixa etária menor. Como a idade está entre os principais fatores de risco (66) e ao considerar que o envelhecimento acumula alterações genéticas que são favoráveis ao câncer (5), é esperado que fatores de mau prognóstico estejam mais presentes na população com idade mais avançada. Entretanto, quando o câncer aparece em pacientes com idade mais jovem, está associado a um prognóstico mais agressivo (74), pelo possível acúmulo de características que tornam o seu aparecimento mais precoce.

A Figura 13 mostra a associação entre o IMC e a classificação TNM. Em relação ao tamanho do tumor (Fig. 13A, p=0,0023), a associação significativa mostra que tumores com o estadiamento T mais elevados (T>2) tem mais casos em pacientes com o IMC alto, e já no grupo com IMC normal há uma quantidade menor de tumores maiores.

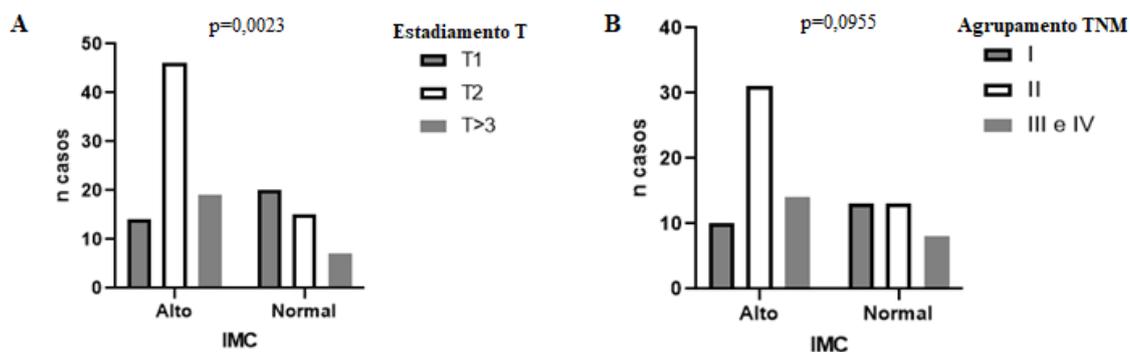


Figura 13 - Variáveis associadas ao IMC. **A** – Estadiamento T (n= 121 e Teste do  $\chi^2$ ). **B** – Agrupamento TNM (n= 89 e Teste do  $\chi^2$ ).

Considerando o agrupamento TNM (Fig. 13B,  $p=0,0955$ ), a associação não foi estatisticamente significativa mas mostra um efeito que pode ter uma importância: o IMC alto apresenta estadiamentos mais altos, relacionando-se, portanto, a tumores com pior prognóstico.

Já foi discutido como o sobrepeso e obesidade estão relacionados ao pior prognóstico. Além disso, o tamanho do tumor por si só é um dos piores fatores prognósticos, estando diretamente relacionado ao risco de recidiva (74). Como o IMC alto está relacionado a tumores maiores, o IMC normal confere um melhor prognóstico ao paciente.

Os receptores hormonais (RH), RE e RP, estão relacionados a fatores de crescimento endógenos e vias de sinalização (66). O RE negativo está correlacionado com a baixa diferenciação tumoral, alta taxa de proliferação celular e outras características desfavoráveis ao prognóstico. Entretanto, apesar de conferir uma sobrevida maior no grupo que possui RE positivo, o bom prognóstico não se mantém a longo prazo (74). A falta de expressão do RP também está ligada a pior prognóstico. Esses tumores (RP-) demonstram ser instáveis e podem se assemelhar ao câncer de mama triplo negativo, além de se relacionar a níveis elevados de Ki67 e maior expressão de HER2 (62). Apesar da ausência da expressão dos RH estarem relacionados ao pior prognóstico, a sua expressão também está relacionada a vias que promovem a proliferação celular e o crescimento do tumor. Porém, os tumores que apresentam expressão de RH respondem bem ao tratamento com moduladores seletivos do RE e RP (62,66), conferindo um melhor prognóstico ao paciente.

A Figura 14 mostra a associação significativa dos RH a necrose tumoral. A necrose tumoral pode definir o risco de recorrência local e transformação invasiva do CDIS, indicando um crescimento rápido (72).

É possível notar um papel oposto da expressão dos RH na necrose tumoral. Enquanto a expressão do RE é maior na ausência de necrose (Fig. 14A,  $p=0,0498$ ), a expressão do RP é menor (Fig. 14B,  $p=0,0211$ ). O RE positivo e o RP negativo parecem estar relacionados a um melhor prognóstico, em relação a necrose tumoral.

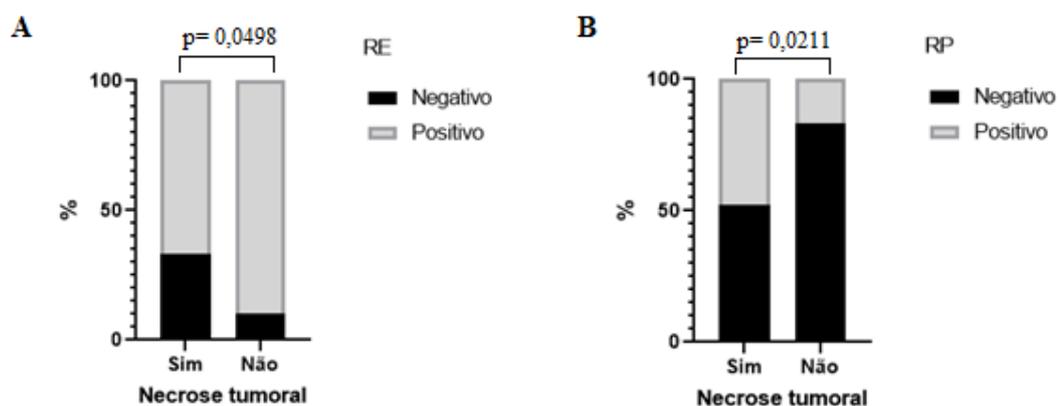


Figura 14 – RE e RP associados a necrose tumoral. **A** – RE ( $n=57$  e Teste de Fisher). **B** – RP ( $n=57$  e Teste de Fisher).

A associação significativa do Ki67 aos RH (Figura 15 A e B,  $p=0,0003$  e  $p=0,0010$ , respectivamente) é esperada, já que ambos envolvem vias de proliferação (18,66). De acordo com a nossa análise, tanto o RE quanto o RP negativos estão associados ao Ki67 alto, indicando um tumor com maior capacidade proliferativa; logo, RH negativos e um Ki67 alto podem estar relacionados a um pior prognóstico.

Já em relação ao tipo de tumor (Fig. 15C) a associação mostra que o Ki67 elevado é mais frequente no tipo CDI, relacionando esse tipo de tumor a fatores de mau prognóstico.

O grau do tumor foi significativamente associado a variáveis relacionadas a imunohistoquímica (RE, RP, Ki67) – Figura 16.

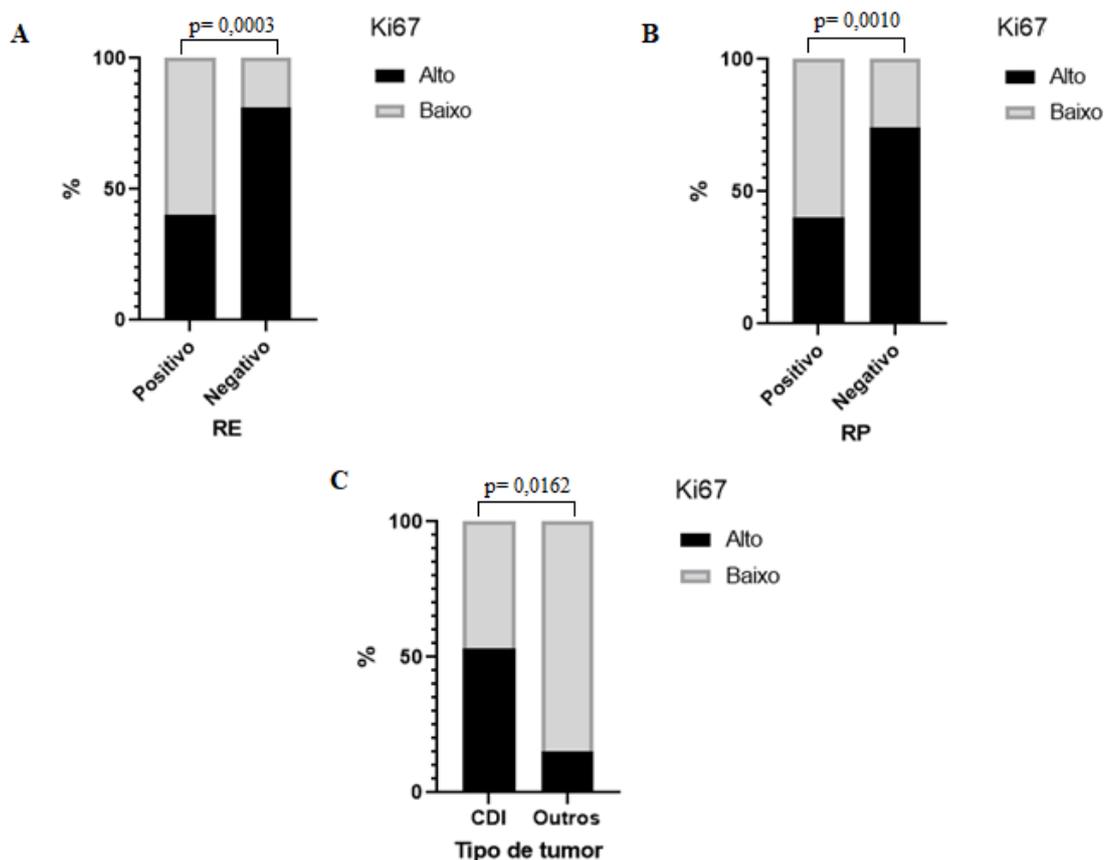


Figura 15 – Variáveis associadas a Ki67. **A** – RE (n= 115 e Teste de Fisher). **B** – RP (n= 115 e Teste de Fisher). **C** – Tipo de tumor (n= 108 e Teste de Fisher).

RE e RP negativos estavam mais presentes em tumores com maiores graus (Fig. 16 A e B,  $p= 0,0095$  e  $p= 0,0062$ , respectivamente). O Ki67 elevado foi mais frequente nos tumores com maior grau (Fig. 16C,  $p= <0,0062$ ).

Considerando que o tumor de alto grau está relacionado a maior recorrência e metástase (61) e que RE e RP negativos e Ki67 alto predispõe um diagnóstico desfavorável (18,62,74), é de se esperar que o tumor triplo negativo, um dos mais agressivos, esteja mais presente nos tumores de Grau 3 e que o luminal e o triplo positivo presentes em graus menores (63) - (Fig. 16 D e E,  $p= <0,0078$  e  $p= 0,0087$ , respectivamente).

Analisando as diversas associações clínicas, observa-se que o Ki67 alto, RE e RP negativos, Grau do tumor 3 e HER2 positivo estavam associados a variáveis de pior prognóstico, confirmando seus valores preditivos clínico.

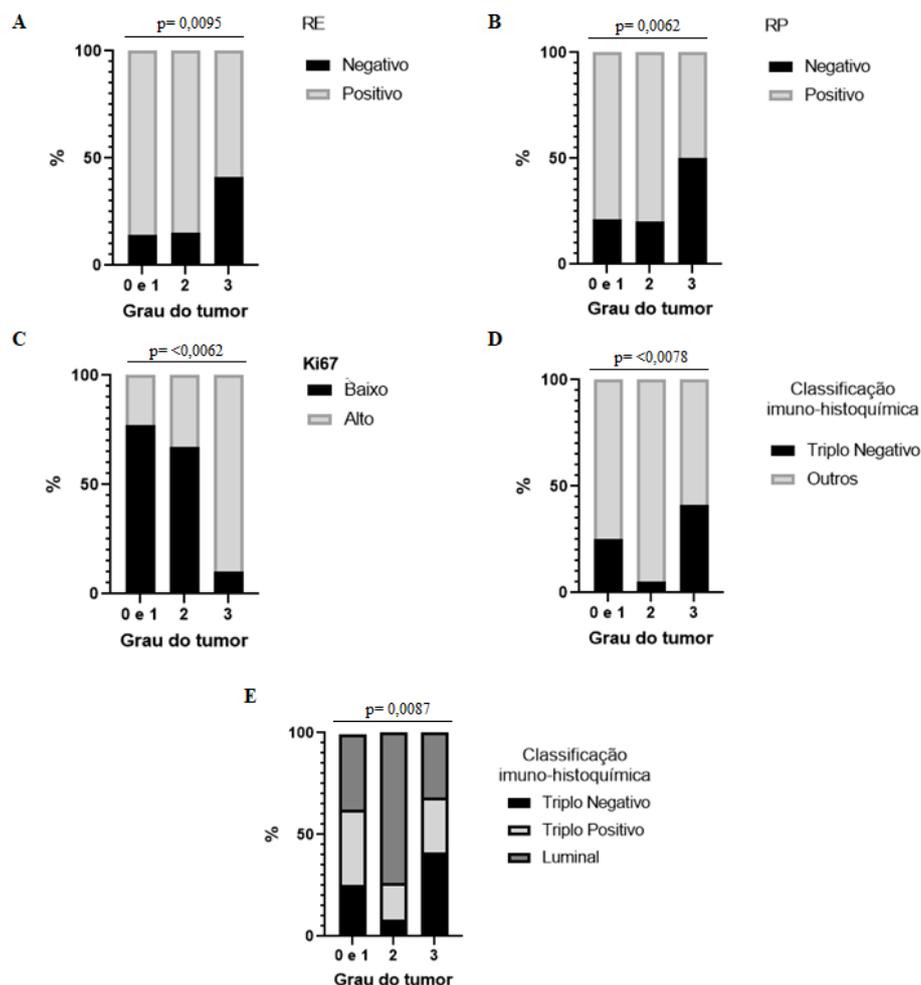


Figura 16 – Variáveis associadas ao Grau do tumor. **A** – RE (n= 109 e Teste do  $X^2$ ). **B** – RP (n= 109 e Teste do  $X^2$ ). **C** – Ki67 (n= 99 e Teste do  $X^2$ ). **D** – Classificação imunohistoquímica (n= 69 e Teste do  $X^2$ ). **E** – Classificação imunohistoquímica (n= 68 e Teste do  $X^2$ ).

### 5.2.2. Polimorfismo rs10078991 e fatores prognósticos

Para as associações relacionadas aos fatores prognósticos, a análise estatística foi realizada apenas para o polimorfismo rs10078991, pois foi um dos únicos a possibilitar a formação de dois grupos com um número amostral considerável.

Apesar do SNP rs2242652 também ter apresentado grupos com um número amostral considerável, a análise dele como fator prognóstico já foi realizado e descrito em outro trabalho do grupo, por isso não pode ser analisado neste trabalho. O trabalho de Monteiro analisou o SNP rs2242652 em 54 pacientes com CM e ainda que não encontrou associações estatisticamente significativas, provavelmente pelo número

amostral, mostrou uma tendência do alelo A, nos genótipos GA/AA, estar relacionado ao pior prognóstico: tendência de relação com tumores mais agressivos, com 33% de triplo-negativo (grupo GG: 19% triplo negativo), 22% de tumores com superexpressão de HER2 (grupo GG: 10% com superexpressão de HER2) e tumores maiores (T4) em 20% dos casos (grupo GG: apenas 8%) (75). Esses resultados mostram a tendência de uma relação importante com o triplo-negativo, que apresenta um pior prognóstico (63), mostrando a relevância de estudos de polimorfismos da telomerase em CM.

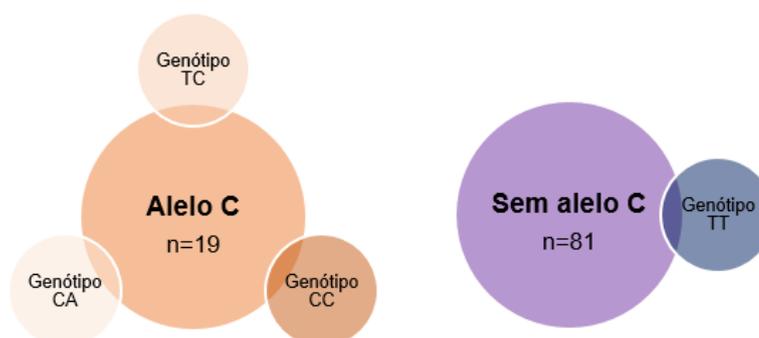


Figura 17 – Formação dos grupos para a análise estatística do polimorfismo rs10078991

Voltando as análises, para o estudo do SNP rs10078991 os grupos foram divididos entre presença do Alelo C (genótipos TC, CC e CA; n= 19) e ausência do Alelo C (genótipo TT; n= 81) – Figura 17.

A Figura 18 mostra a associação da variante gênica com a expressão do RP.

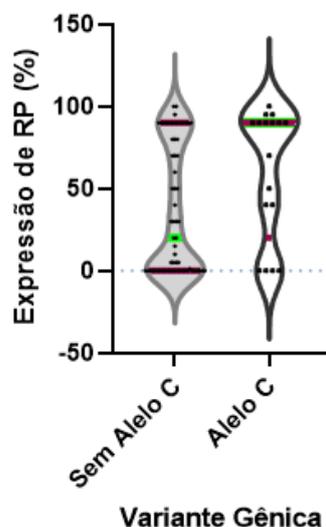


Figura 18 – RP associado a variante gênica para o SNP rs10078991 (p= 0,0419, n= 82 e Teste de Mann Whitney)

Observa-se que a expressão do RP é maior no grupo Alelo C, e com mais casos de sem expressão (RP-) no grupo Sem Alelo C. Sabendo do valor prognóstico tanto da presença quanta da ausência desse receptor no CM, a presença do Alelo C indica um fator de proteção, já que o RP+ é indicativo de melhor prognóstico (62). Nesse estudo, a presença do RP está ligada a variáveis de melhor prognóstico (maior nos graus do tumor mais baixos e maior no Ki67 baixo), com exceção da necrose tumoral. Para quem tem CM, ter o alelo T em homozigoze (genótipo TT) confere uma chance maior de ter uma baixa expressão de RP, que pode implicar em um câncer mais agressivo por ter RP baixo.

Uma meta-análise encontrou associação de outros polimorfismos do gene *hTERT* com os RH em casos de CM: o genótipo CC para rs2735940 e o genótipo TT para rs2736100 estão associados a casos RH negativos (RE-/RP-) [OR= 1,52, IC 95% 1,21-1,91, p= 0,0003 e OR= 1,5, 95% IC 1,2-1,87, p= 0,0007, respectivamente] (25). Já o presente trabalho encontrou relação do genótipo TT (grupo sem o Alelo C) com a menor expressão de RP para o polimorfismo rs10078991 (p= 0,0419).

Outro achado interessante descrito nos artigos da meta-análise foi a associação de variantes de *hTERT* com a expressão de receptores hormonais (25):

- rs10069690: associado ao RE negativo e ao subtipo de câncer triplo negativo;
  - O alelo de risco (alelo T) pode ser responsável por uma taxa de incidência de 15% (IC 95%, 10-20%) superior para o CM em RE- ou triplo-negativo em mulheres africanas em comparação com mulheres de ascendência europeia
- rs273618: associado a casos RE- e RP+;
- rs10069690, rs2735940, rs4246742 e rs2736100: associados a RH negativos.

Considerando esses achados, as amostras foram reagrupadas em dois grupos para verificar a influência do alelo T ao RP: grupo com alelo T (genótipos TC e TT) e grupo sem alelo T (genótipos CA e CC). A associação não foi significativa, o que deixa mais claro que a influência em relação a baixa expressão do RP está associada apenas ao alelo T em homozigoze.

Apesar da influência do alelo T como fator de proteção para o CM (Tabela 4 e Figura 9 – seção 4.2.3 - Determinação do fator de risco), como fator prognóstico o genótipo TT está associado a um fator de mau prognóstico em relação a expressão de RP.

Para algumas variáveis clínicas a associação com o polimorfismo foi estudada por grupo – Alelo C e Sem Alelo C, para analisar se alguma variante gênica demonstra influência sobre a variável clínica. As correlações significativas encontradas estão no Quadro 9.

As variáveis Idade ao diagnóstico e linfonodos acometidos, no grupo Sem Alelo C, foram diretamente proporcionais: uma aumenta e a outra também. Essas variáveis clínicas demonstram uma tendência de sofrer influência dessa variante gênica pois foram próximas ao valor significativo nesse grupo ( $p= 0,06$ ), mas não no grupo Alelo C ( $p= 0,92$ ), mostrando uma associação dessas variáveis clínicas para o genótipo TT – o grupo sem alelo C, com o único genótipo desse estudo que não apresenta o alelo C. É provável que para aqueles que não tenham o Alelo C e tenham idade menor, tenham menos linfonodos acometidos; da mesma forma que os pacientes com uma idade maior tenham maior comprometimento de linfonodos.

Quadro 9 – Teste de correlação de Spearman

<b>Associação</b>	<b>Variante Gênica</b>	<b>Valor de P</b>	<b>N total</b>	<b>Valor de R</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>
Idade ao diagnóstico x Linfonodos acometidos	Alelo C	0,9219	10	-0,03814	
	Sem Alelo C	0,0663	40	0,2933	-0,02961 a 0,5607
RE e Ki67	Alelo C	0,3121	15	0,2783	-0,2883 a 0,7005
	Sem Alelo C	0,0014	58	-0,4099	-0,6092 a -0,1620
RP e Ki67	Alelo C	0,2937	15	0,2890	-0,2776 a 0,7064
	Sem Alelo C	0,0045	58	-0,3677	-0,5769 a -0,1132

Em relação ao Ki67, o grupo Sem Alelo C com alta expressão de RH demonstrou um efeito benéfico: quanto maior a expressão dos RH, menor o valor de Ki67 – pois são inversamente proporcionais (valor de R menor que 0). Para o genótipo TT (grupo sem o Alelo C) esse resultado é benéfico em relação ao Ki67, pois teve a capacidade proliferativa reduzida (18,62,66); porém caso apresente RH baixos, apresentará capacidade proliferativa aumentada, indicando um tumor mais agressivo (62).

Como vimos na Figura 12, os RH negativos estão associados ao Ki67 elevado. Esse resultado foi semelhante aqui (Quadro 9, RH e Ki67), demonstrando influência apenas para o grupo Sem Alelo C, já que naqueles que tinham o Alelo C essa correlação não foi significativa.

Em relação a classificação TNM, quanto maior a categoria do estadiamento, pior o prognóstico: indicativo de um tumor mais agressivo (65). Nas Figuras 19 a 23 temos associações quanto a essa classificação.

O comprometimento linfonodal é proporcional ao tamanho do tumor (74). Na Figura 19 (Fig. 19B,  $p=0,0031$ ), apesar de ter alguns casos de metástase em linfonodos classificados como mais severos (N2 e N3), os casos com ausência ou menor comprometimento de linfonodos são mais frequentes, mesmo nos tumores maiores, associando, portanto, o genótipo TT (grupo sem o Alelo C) a um melhor prognóstico. Já para o grupo Alelo C (Fig. 19A) não houve uma associação significativa ( $p=0,6485$ ).

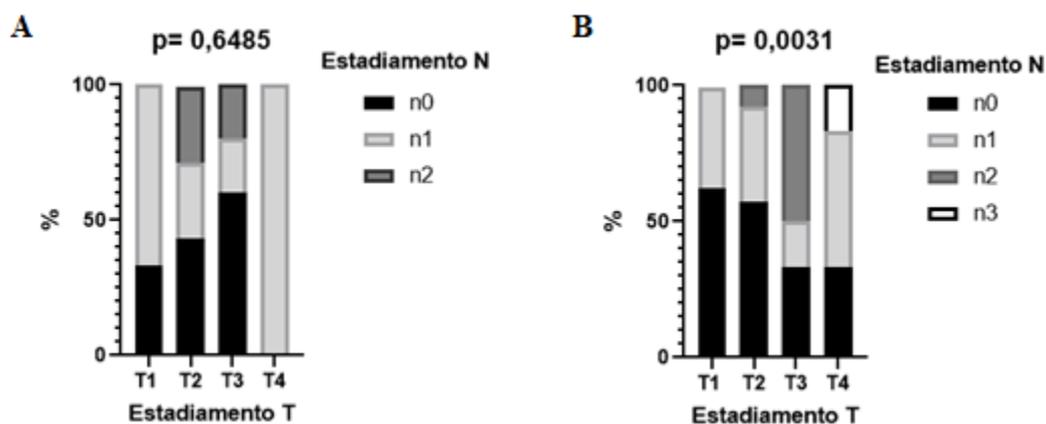


Figura 19 – Associação entre Estadiamento T e Estadiamento N. **A** – Variante gênica Alelo C ( $n=16$  e Teste do  $X^2$ ). **B** – Variante gênica Sem Alelo C ( $n=65$  e Teste do  $X^2$ ).

Para o IMC, no grupo Sem Alelo C (Fig. 20B,  $p=0,0372$ ), a porcentagem de sobrepeso (IMC alto) e obesidade foi maior em quase todos os tumores acima de 2 cm ( $>T1$ ). Para os pacientes com esse genótipo, o IMC alto pode aumentar o risco de tumores maiores.

A associação com o grupo Alelo C (Fig. 20A,  $p=0,1850$ ) não pode ser assegurada pois não foi significativa.

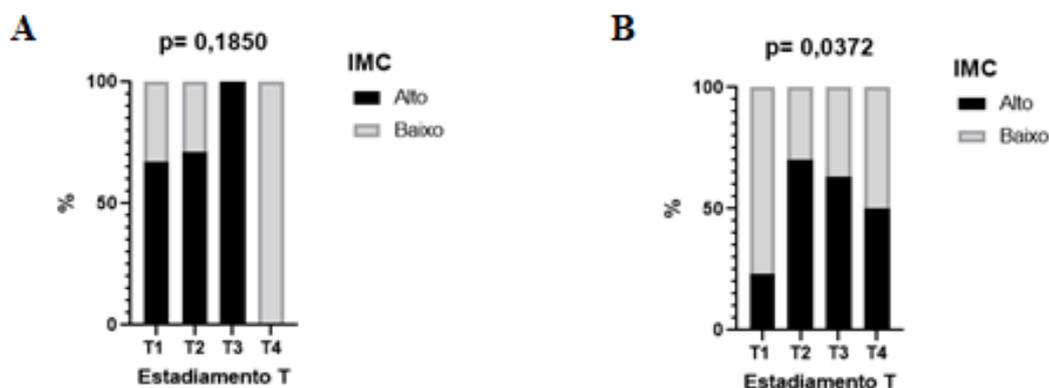


Figura 20 – Associação entre Estadiamento T e IMC. **A** – Variante gênica Alelo C (n= 16 e Teste do  $\chi^2$ ). **B** – Variante gênica Sem Alelo C (n= 60 e Teste do  $\chi^2$ ).

A associação significativa para o Alelo C foi entre o Estadiamento N e o IMC (Fig. 21A,  $p=0,0117$ ). O IMC baixo foi presente apenas no N1, associando o peso normal ao comprometimento em linfonodo móvel (N1), que é menos agressivo (74). O IMC alto não pode estar associado a pior prognóstico para esta variante gênica porque está ligado tanto a ausência de metástase em linfonodos (N0) quanto a metástase em linfonodos fixos (N2).

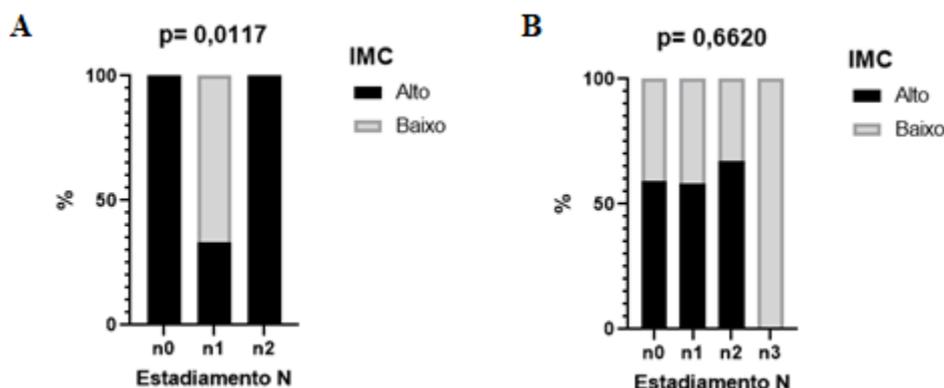


Figura 21 – Associação entre Estadiamento N e IMC. **A** – Variante gênica Alelo C (n= 16 e Teste do  $\chi^2$ ). **B** – Variante gênica Sem Alelo C (n= 58 e Teste do  $\chi^2$ ).

Sobre a idade ao diagnóstico, Abreu & Koifman afirmam que o CM tanto em mulheres mais novas quanto em maiores de 75 anos apresentam um pior prognóstico (74). É o que observamos nesse estudo, no grupo com o genótipo TT (grupo sem o Alelo C) (Fig 22B,  $p=0,0580$ ). Os casos com o pior prognóstico, em relação a comprometimento de linfonodos, foram mais frequentes nos pacientes que apresentaram CM mais precocemente.

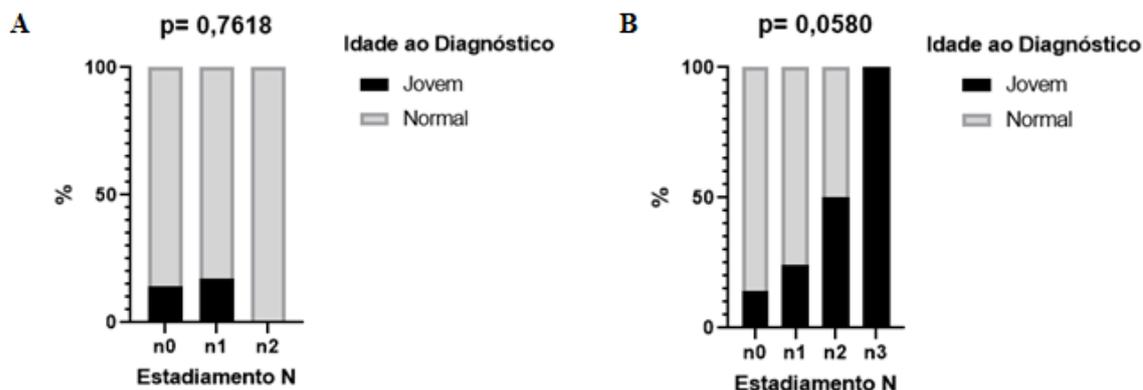


Figura 22 – Associação entre Estadiamento N e Idade ao diagnóstico. **A** – Variante gênica Alelo C (n= 16 e Teste do  $X^2$ ). **B** – Variante gênica Sem Alelo C (n= 63 e Teste do  $X^2$ ).

Associando as variantes gênicas com o infiltrado inflamatório encontramos o seguinte (Figura 23): no grupo com o Alelo C houve mais casos de infiltrado inflamatório do que no grupo Sem Alelo C. Ou seja, no grupo com o genótipo TT (grupo sem o Alelo C) há chance de um pior prognóstico, em relação ao infiltrado inflamatório. Como a presença do infiltrado inflamatório está relacionado a resposta imunológica contra o tumor e conseqüente melhor prognóstico (76), esse resultado é benéfico ao grupo com o Alelo C, onde houve presença do infiltrado na maioria dos casos. Apesar do valor de p ser maior que 0,05 e, portanto, não ser significativo estatisticamente para esta associação, este valor está próximo do significativo e o seu efeito foi considerado importante.

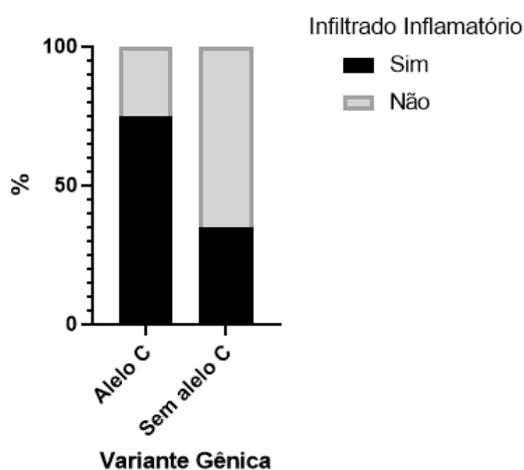


Figura 23 – Variante gênica associada ao Infiltrado inflamatório ( $p= 0,0957$ , n= 28 e Teste de Fisher)

O grupo Sem Alelo C – dos pacientes com o genótipo TT – apresentou resultados tanto favoráveis quanto desfavoráveis ao prognóstico do CM, a depender da variável estudada. Em relação a um bom prognóstico, mesmo os tumores maiores apresentaram menor comprometimento de linfonodos (Figura 19). Em contrapartida, as seguintes variáveis foram relacionadas a um pior prognóstico:

- RP: menor expressão de RP (Figura 18)
- IMC e estadiamento T: IMC alto associado a tumores maiores (Figura 20)
- Infiltrado inflamatório: menor resposta inflamatória (Figura 21)

Para o Ki67 e a expressão de RH, o grupo Sem Alelo C (genótipo TT) pode conferir um resultado que pode ser particular: é bom ao apresentar valores baixos para o Ki67 e RH altos, ou ruim por apresentar valores altos para o Ki67 e baixa expressão de RH. Esse resultado tem um valor clínico que depende muito do caso do paciente: a maior expressão de RH apresenta um melhor prognóstico e o Ki67 baixo também é um bom fator prognóstico (18,61,62,74).

O grupo Alelo C – pacientes com o genótipo TC, GC e CA – apresentou melhor relação com um bom prognóstico para o CM nas seguintes variáveis clínicas:

- RP: maior expressão de RP (Figura 18)
- IMC e N1 (Estadiamento N): peso normal e menor comprometimento de linfonodos (Figura 21)
- Infiltrado inflamatório: maior presença de infiltrado inflamatório (Figura 23)

No geral, algumas associações mostram uma tendência de significado, mas com valor de p acima de 0,05. Esses resultados possivelmente foram afetados pelo número amostral pequeno; aumentando o grupo será possível confirmar ou descartar essas associações.

Estes resultados mostram associações com bons fatores prognósticos e indicam a possibilidade de novos achados. Para determinar o valor e alcance prognóstico desse polimorfismo é importante também testar as análises em outros grupos, com outros tipos de câncer. Confirmando as associações e a relação com o câncer, esse polimorfismo se torna bom candidato para ser usado como marcador de risco e prognóstico.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a crescente dos casos de câncer os estudos nessa área almejam novas formas de diagnóstico, tratamento e prognóstico. O estudo com polimorfismos pode tocar essas três bases e, portanto, contribuir para o avanço do combate ao câncer. No Brasil e no mundo, o câncer de mama é um dos mais frequentes, o que mostra a importância de estudos nessa área por ter grande relevância no tratamento de uma doença de impacto mundial. Nossa pesquisa relacionou 325 genes e 1900 polimorfismos ao câncer de mama, relatando os genes mais estudados (*MTHFR*, *ESR1*, *GSTM1* e *GSTT1*). Também foi observado a baixa frequência de estudos que analisam a relação de polimorfismos da telomerase ao risco de câncer de mama. Apesar de alguns resultados de associação divergentes, foram relatadas muitas associações significativas, mostrando os genes que tem impacto na doença e que podem fazer parte de perfis genéticos associados ao risco aumentado de câncer de mama.

Para verificar o valor clínico de polimorfismos do gene *hTERT*, esse estudo analisou 8 polimorfismos na região promotora da telomerase em indivíduos do DF e encontrou uma tendência de associação com o câncer de mama para o polimorfismo rs10078991 ( $p= 0,06$ ), que apresentou maior fator de risco para câncer de mama naqueles casos em que não há presença do alelo T. Apesar dos outros polimorfismos não apresentarem resultados significativos, o SNP rs980822475 teve um valor de p baixo ( $p= 0,16$ ), demonstrando uma tendência de associação que pode ser confirmada ou excluída ao se aumentar o número amostral. Esses resultados são novos para esses polimorfismos e contribuem à pesquisa de polimorfismos em câncer, já que não há publicações em evidência na literatura sobre eles.

Em relação aos fatores prognósticos, o SNP rs10078991 foi associado a um pior prognóstico para o genótipo TT, em relação a baixa expressão do receptor de progesterona, enquanto a presença do Alelo C foi associado ao melhor prognóstico por maior expressão do RP. Para outras variáveis clínicas, os principais achados associaram o genótipo TT ao IMC alto e tumores maiores, menor resposta inflamatória e Ki67 e RH inversamente proporcionais. Com exceção do Ki67, essas variáveis associam o genótipo TT a um pior prognóstico. Já o grupo que apresentava o Alelo C (genótipos TC, GC e CA) foi associado ao melhor prognóstico: maior expressão de

RP, menor comprometimento de linfonodos para pacientes com IMC normal e maior presença de infiltrado inflamatório.

Comparando os resultados do fator de risco e prognóstico para o SNP rs10078991, o genótipo TT demonstrou ter um efeito protetor em relação ao desenvolvimento do câncer de mama, enquanto que para o prognóstico, um resultado menos favorável está associado para aqueles que possuem o genótipo TT, pois foi associado a fatores de pior prognóstico.

Outro resultado importante relatado nesse estudo confirma o valor prognóstico de variáveis clínicas já utilizadas no câncer de mama. Comparando as variáveis clínicas de 151 pacientes com câncer de mama, observamos que o Ki67 alto, RH negativos, Grau do tumor 3 e HER2 positivo estavam associados a variáveis de pior prognóstico, confirmando seus valores preditivos clínico.

Em resumo, os achados da pesquisa deixam em evidência o SNP rs10078991 para ser utilizado como um marcador para o câncer de mama, já que apresentou relevância como fator de risco e prognóstico para o câncer de mama.

O presente trabalho trouxe uma sequência muito grande de informações que podem ajudar a determinar algumas teses biológicas sobre o desenvolvimento da doença. Mesmo aquelas informações não significativas apresentam valor científico por mostrar caminhos a não serem considerados em novos trabalhos. Dessa forma, este estudo contribui para o entendimento cada vez mais avançado sobre o câncer de mama, que é doença muito complexa – e, por isso, cada nova informação na literatura tem a sua significância.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics: Cancer** [Internet]. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acessado em: 20/04/2018.
2. National Cancer Institute. **Defining Cancer** [Internet]. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>. Acessado em: 20/04/2018.
3. AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Is Cancer?** [Internet]. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acessado em: 20/04/2018.
4. Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Exp Cell Res.** 318 (4): 299–310. 2012.
5. Li H, Xu Y, Mei H, Peng L, Li X, Tang J. The TERT rs2736100 polymorphism increases cancer risk: A meta-analysis. **Oncotarget.** 8 (24): 38693–705. 2017.
6. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **O que é o câncer?** [Internet]. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acessado em: 20/04/2018.
7. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin.** 65 (2): 87–108. 2015.
8. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA.** 162 p. 2022.
9. Karimian M, Rezazadeh N, Khomehchian T. Association analysis of methylenetetrahydrofolate reductase common gene polymorphisms with breast cancer risk in an iranian population: A case-control study and a stratified analysis. **Asian Pacific J Cancer Prev.** 21 (9): 2709–14. 2020.
10. Rajagopal T, Seshachalam A, Rathnam KK, Jothi A, Talluri S, Venkatabalasubramanian S, et al. Impact of xenobiotic-metabolizing gene polymorphisms on breast cancer risk in South Indian women. **Breast Cancer Res Treat.** 186 (3): 823–37. 2021.
11. Tan SC, Low TY, Mohamad Hanif EA, Sharzehan MAK, Kord-Varkaneh H, Islam MA. The rs9340799 polymorphism of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene and its association with breast cancer susceptibility. **Sci Rep.** 11 (1): 1–12. 2021.

12. Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT, Kotsis A. The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. **Cancer Lett.** 222 (1): 57–65. 2005.
13. Hesari A, Maleksabet A, Tirkani AN, Ghazizadeh H, Iranifar E, Mohagheg F, et al. Evaluation of the two polymorphisms rs1801133 in MTHFR and rs10811661 in CDKN2A/B in breast cancer. **J Cell Biochem.** 120 (2): 2090–7. 2019.
14. Jahandoost S, Farhangian P, Abbasi S. The Effects of Sex Protein Receptors and Sex Steroid Hormone Gene Polymorphisms on Breast Cancer Risk. **J Natl Med Assoc.** 109 (2): 126–38. 2017.
15. AMERICAN CANCER SOCIETY. **Types of Breast Cancer** [Internet]. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>>. Acesso em: 13/12/2023.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de mama: vamos falar sobre isso? Rio de Janeiro: **INCA**. 12. 2023.
17. Park CK, Lee SH, Kim JY, Kim JE, Kim TM, Lee ST, et al. Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. **Oncotarget.** 5 (10): 3399–407. 2014.
18. Peruzzi CP, Andrade VRM. Análise dos marcadores imuno-histoquímicos associados com câncer de mama em mulheres na Região das Missões, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras Mastol.** 26 (4): 181–5. 2016.
19. Bertucci F, Orsetti B, Nègre V, Finetti P, Rougé C, Ahomadegbe JC, et al. Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. **Oncogene.** 27 (40): 5359–72. 2008.
20. ZOU P, et. al. The TERT rs2736100 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 25 case-control studies. **BMC Cancer.** 12: 7. 2012.
21. Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL, Zeferino LC. Carcinoma de mama: Novos conceitos na classificação. **Rev Bras Ginecol e Obstet.** 30 (1): 42–7. 2008.
22. Del Chiaro M, Segersvärd R, Löhr M, Verbeke C. Early detection and prevention of pancreatic cancer: Is it really possible today? **World J Gastroenterol.** 20 (34): 12118–31. 2014.
23. Pesch B, Brüning T, Johnen G, Casjens S, Bonberg N, Taeger D, et al. Biomarker research with prospective study designs for the early detection of

- cancer. **Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics**. 1844 (5): 874–83. 2014.
24. Lee HW, Lawton C, Na YJ, Yoon S. Robustness of chemometrics-based feature selection methods in early cancer detection and biomarker discovery. **Stat Appl Genet Mol Biol**. 12 (2): 207–23. 2013.
  25. Rodrigues KS, Neto JNM, Haddad R, Oliveira DM. Clinical relevance of telomerase polymorphism for breast cancer: A systematic review. **J BUON**. 22 (6): 1494–9. 2017.
  26. Khan Y, Khan NU, Ali I, Khan S, Khan AU, Iqbal A, et al. Significant association of BRCA1 (rs1799950), BRCA2 (rs144848) and TP53 (rs1042522) polymorphism with breast cancer risk in Pashtun population of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. **Mol Biol Rep**. 50 (7): 6087–96. 2023.
  27. Parvin S, Islam MS, Al-Mamun MMA, Islam MS, Ahmed MU, Kabir ER, et al. Association of BRCA1, BRCA2, RAD51, and HER2 gene polymorphisms with the breast cancer risk in the Bangladeshi population. **Breast Cancer**. 24 (2): 229–37. 2017.
  28. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, et al. **Conceitos de Genética**. Porto Alegre: Artmed. Capítulo 16. 2010.
  29. Schaefer GB, Thompson J. **Genética Médica**. Porto Alegre: Artmed. Capítulo 7. 2015.
  30. Schaefer GB, Thompson J. **Genética médica**. Porto Alegre: Artmed. Capítulo 6. 2015.
  31. Almeida M, Soares M, Fonseca-Moutinho J, Ramalhinho AC, Breitenfeld L. Influence of estrogenic metabolic pathway genes polymorphisms on postmenopausal breast cancer risk. **Pharmaceuticals**. 14 (2): 1–9. 2021.
  32. Gautam P, Feroz Z, Tiwari S, Vijayaraghavalu S, Shukla GC, Kumar M. Investigating the Role of Glutathione S-Transferase Genes, Histopathological and Molecular Subtypes, Gene-Gene Interaction and Its Susceptibility to Breast Carcinoma in Ethnic North-Indian Population. **Asian Pacific J Cancer Prev**. 23 (10): 3481–90. 2022.
  33. Kalacas NA, Garcia JA, Ortin TS, Valdez A, Fellizar A, Ramos MC, et al. GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and breast cancer risk in selected Filipino cases. **Asian Pacific J Cancer Prev**. 20 (2): 529–35. 2019.
  34. Kimi L, Ghatak S, Yadav RP, Chhuani L, Lallawmzuali D, Pautu JL, et al.

- Relevance of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Gene Polymorphism to Breast Cancer Susceptibility in Mizoram Population, Northeast India. **Biochem Genet.** 54 (1): 41–9. 2016.
35. Possuelo LG, Peraça CF, Eisenhardt MF, Dotto ML, Cappelletti L, Foletto E, et al. Polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes in breast cancer susceptibility: a case-control study. **Rev Bras Ginecol e Obs.** 35 (12): 569–74. 2013.
  36. Tagoe EA, Arko-Boham B, Adjorogbe B, Aryee NA, Adadey SM, Quaye O, et al. Glutathione S-Transferase T1 and M1 Gene Polymorphisms among Breast Cancer Susceptible Ghanaians. **Clinical-Invastigation.** 7 (2): 119–25. 2017.
  37. Porras L, Ismail H, Mader S. Positive regulation of estrogen receptor alpha in breast tumorigenesis. **Cells.** 10 (11). 2021.
  38. Son BH, Kim MK, Yun YM, Kim HJ, Yu JH, Ko BS, et al. Genetic polymorphism of ESR1 rs2881766 increases breast cancer risk in Korean women. **J Cancer Res Clin Oncol.** 141 (4): 633–45. 2015.
  39. Zhang ZL, Zhang CZ, Li Y, Zhao ZH, Yang SE. Association between ER $\alpha$  gene Pvu II polymorphism and breast cancer susceptibility. **Med (United States).** 97 (17). 2018.
  40. Pellatt AJ, Wolff RK, Torres-mejia G, John EM, Jennifer S, Lundgreen A, et al. Telomere Length, Telomere-Related Genes, and Breast Cancer Risk: The Breast Cancer Health Disparities Study. **Gene Chromosomes Cancer.** 52 (7): 595–609. 2013.
  41. Shen N, Lu Y, Wang X, Peng J, Zhu Y, Cheng L. Association between rs2853669 in TERT gene and the risk and prognosis of human cancer: A systematic review and metaanalysis. **Oncotarget.** 8 (31): 50864–72. 2017.
  42. Guerra MR, Mendonça GAS, Teixeira MTBT, Cintra JRD, Carvalho LM, Magalhães LMPV. Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Cad Saude Publica.** 25 (11): 2455–66. 2009.
  43. Zhou P, Wei L, Xia X, Shao N, Qian X, Yang Y. Association between telomerase reverse transcriptase rs2736100 polymorphism and risk of glioma. **J Surg Res.** 191 (1): 156–60. 2014.
  44. Zhang J, Ju H, Gao J-R, Jiao X-L, Lu Y. Polymorphisms in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene, gene-gene and gene-smoking interaction with susceptibility to gastric cancer in Chinese Han population. **Oncotarget.** 8

- (12): 20235–43. 2017.
45. Coltro ML. Bem jurídico penal e pesquisa com células-tronco embrionárias. **Dissertação de Graduação**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 68–70. 2007.
  46. SBMSP. Assinaturas genéticas. **Soc Bras Mastol Reg São Paulo**. 15 (97). 2012.
  47. Pang T, Zhou M, Liu R, Luo J, Xia R. TERT rs2736098 (Ex2-659G > A) polymorphism and cancer susceptibility: Evidence from a comprehensive meta-analysis. **Oncotarget**. 8 (56): 96433–41. 2017.
  48. He G, Song T, Zhang Y, Chen X, Xiong W, Chen H, et al. TERT rs10069690 polymorphism and cancers risk: A meta-analysis. **Mol Genet genomic Med**. 7 (10): e00903. 2019.
  49. Liu Z, Wang T, Wu Z, Zhang K, Li W, Yang J, et al. Association between TERT rs2853669 polymorphism and cancer risk: A meta-analysis of 9,157 cases and 11,073 controls. **PLoS One**. 13 (3): e0191560. 2018.
  50. Shen J, Gammon MD, Terry MB, Bradshaw PT, Wang Q, Teitelbaum SL, et al. Genetic polymorphisms in telomere pathway genes, telomere length and breast cancer survival. **Breast Cancer Res Treat**. 134 (1): 393–400. 2012.
  51. Liu Z, Wang T, Wu Z, Zhang K, Li W, Yang J, et al. Association between TERT rs2853669 polymorphism and cancer risk: A metaanalysis of 9, 157 cases and 11, 073 controls. **PLoS One**. 13 (3): 1–11. 2018.
  52. Zhou M, Jiang B, Xiong M, Zhu X. Association between TERT rs2736098 polymorphisms and cancer risk-A meta-analysis. **Front Physiol**. 9 (APR): 1–12. 2018.
  53. Ségal-Bendirdjian E, Geli V. Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglio. **Front Cell Dev Biol**. 7 (December): 1–12. 2019.
  54. Rodrigues KS. Polimorfismo rs2736100 do gene hTERT em pacientes com câncer de mama. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 2017.
  55. Choi BJ, Yoon JH, Kim O, Choi WS, Nam SW, Lee JY, et al. Influence of the hTERT rs2736100 polymorphism on telomere length in gastric cancer. **World J Gastroenterol**. 21(31): 9328–36. 2015.
  56. Matta RRC da, Ramos HE. Mutação do promotor TERT no carcinoma anaplásico da tireoide: um relato de caso. **Rev Ciências Médicas e Biológicas**.

- 20 (3): 480–4. 2021.
57. Qasem E, Murugan AK, Al-Hindi H, Xing M, Almohanna M, Alswailem M, et al. TERT promoter mutations in thyroid cancer: A report from a Middle Eastern population. **Endocr Relat Cancer**. 22 (6): 901–8. 2015.
58. Ministérios da Saúde (Brasil). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**. 2019.
59. National Cancer Institute. **Obesity and Cancer: Pursuing Precision Public Health** [Internet]. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/research/annual-plan/scientific-topics/obesity>>. Acesso em: 06/08/2021.
60. Ministérios da Saúde (Brasil). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Causas e Prevenção: peso corporal. Rio de Janeiro: **INCA**. 2021.
61. Rakha EA, Reis-filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**. 12 (207): 1–12. 2010.
62. Pedroza DA, Subramani R, Lakshmanaswamy R. Classical and non-classical progesterone signaling in breast cancers. **Cancers (Basel)**. 12: 1–16. 2020.
63. Cintra JRD, Teixeira MTB, Diniz RW, Gonçalves Junior H, Florentino TM, Freitas GF De, et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Rev Assoc Med Bras**. 58 (2): 178–87. 2012.
64. Piñeros M, Parkin DM, Ward K, Chokunonga E, Ervik M, Farrugia H, et al. Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information. **Lancet Oncol**. 20 (2): e103–11. 2019.
65. Ministérios da Saúde (Brasil). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). TNM: Classificação de Tumores Malignos. 6ª. Uicc. Rio de Janeiro: **INCA**. 254 p. 2004.
66. British Medical Journal. **Câncer de Mama Invasivo Primário** [Internet]. Disponível em: <<https://bestpractice.bmj.com/topics/pt-br/716>>. Acesso em: 29/07/2021
67. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: How special are they? **Mol Oncol**. 4: 192–208. 2010.
68. De Aquino RGF, Vasques PHD, Cavalcante DIM, Oliveira AL de S, De Oliveira BMK, Pinheiro LGP. Carcinoma ductal invasor: Relação de características anatomopatológicas com a presença de metástases axilares em 220 casos. **Rev**

- Col Bras Cir.** 44 (2): 163–70. 2017.
69. Figueroa-González G, Arellano-Gutiérrez CV, Cortés H, Leyva-Gómez G, Carmen MG-D, Bustamante-Montes LP, et al. Breast cancer-related single-nucleotide polymorphism and their risk contribution in Mexican women. **J Cancer Res Ther.** 16 (6): 1279–86. 2020.
70. Silva AR, Gobbi H. Mama Carcinoma in situ. **Sociedade Brasileira de Patologia.** 2019.
71. Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. **Breast Cancer Res.** 10 (4): 1–9. 2008.
72. ACRUX TM. Carcinoma Ductal in Situ Da Mama (CDIS) Puro E Associado Ao Invasivo: Correlação Dos Achados Arquiteturais, Citológicos, Imuno-Histoquímicos E Análise De Recorrência. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia. 2017.
73. Fernandes GDS, Calabrich A, Katz A. Câncer De Mama Triplo-Negativo: Aspectos Clínicos, Laboratoriais E Terapêuticos. **Rev Bras Mastol.** 19 (2): 76–82. 2009.
74. Abreu E De, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Rev Bras Cancerol.** 48 (1): 113–31. 2002.
75. Monteiro M, Vilela A. Polimorfismo rs2242652 do gene hTERT em mulheres com câncer de mama. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 2019.
76. Tavares MC. Caracterização do infiltrado inflamatório e associação com expressão proteica de pd-1 , pd-l1 e pd-l2 e sobrevida em carcinoma mamário triplo-negativo. **Dissertação de Mestrado.** Fundação Antônio Prudente, São Paulo, São Paulo. 2018.

## ANEXOS

## ANEXO A – Parecer CEP/FCE/UnB

UNB - FACULDADE DE  
CEILÂNDIA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS AO GENE hTERT EM PACIENTES COM CÂNCER NO DISTRITO FEDERAL.

**Pesquisador:** Diêgo Madureira de Oliveira

**Área Temática:** Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 98798718.9.0000.8093

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ceilândia - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.036.843

## Apresentação do Projeto:

“O Câncer é um problema global de saúde, e acarreta em elevados custos econômicos e sociais também no Brasil. Parte do sucesso de políticas, para a redução da mortalidade por câncer está ligada ao desenvolvimento de programas de diagnóstico e prevenção precoces, que por sua vez, dependem do uso de indicadores diagnósticos e prognósticos adequados. Há muito tempo mutações específicas tem se prestado a esse fim, é o caso do BRCA para câncer de mama e T790M para câncer de pulmão. Estudos recentes vêm demonstrando o potencial de mutações no gene da enzima telomerase (essencial para o processo de formação tumoral), hTERT, como marcadores prognósticos e fatores de risco, mas não há dados precisos acerca dessas mutações na população brasileira, e principalmente do Distrito Federal. Dados preliminares de trabalho do grupo no tema apontam para a presença de diversas alterações típicas da população local nessa região gênica. Uma vantagem do estudo de mutações germinativas é que, por se tratarem estas de características genéticas do indivíduo, e não do tumor, é possível acessar tais informações a qualquer tempo, mesmo antes da doença diagnosticada (nos casos de pacientes com histórico familiar, por exemplo), permitindo a antecipação de condutas. Além disso, a possibilidade de se estudar marcadores usando amostras de sangue periférico ou tecidos de fácil coleta no lugar de fragmentos do tumor traz facilidades adicionais na implementação clínica dessas análises, bem

**Endereço:** UNB - Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED), Centro Metropolitano, conj. A, lote 01, Sala AT0766  
**Bairro:** CEILÂNDIA SUL (CEILÂNDIA) **CEP:** 72.220-000  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-8434 **E-mail:** cep.fce@gmail.com

## ANEXO B – TCLE CETTRO



Universidade de Brasília

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE**

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar do projeto de pesquisa ESTUDO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS AO GENE hTERT EM PACIENTES COM CÂNCER NO DISTRITO FEDERAL, sob a responsabilidade do pesquisador Diêgo Madureira de Oliveira. O projeto trata-se de um estudo que visa à descoberta de características genéticas que possam estar associadas ao desenvolvimento do câncer. Para isso, serão estudadas amostras de DNA extraído a partir de sangue coletado dos voluntários, assim como os dados clínicos registrados em prontuário médico.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

Ao aceitar participar do estudo, o único desconforto ao qual será submetido é a coleta de sangue por punção de veia periférica, procedimento que envolve baixo risco, mas moderado grau de desconforto físico. **Assim, ao assinar este termo, o(a) Senhor(a) autorizará a coleta de 4 mL de sangue, que será feita por profissional qualificado, em ambiente adequado e com material estéril e descartável, a fim de minimizar qualquer risco de dano físico, além do acesso da equipe de pesquisadores aos dados no seu prontuário médico.** O acesso aos resultados obtidos com o estudo, bem como informações e orientações que possam resultar em reavaliação de conduta terapêutica, aconselhamento genético ou qualquer outro benefício direto, é garantido a todos os participantes.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a).

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo a coleta de sangue.

Também não há compensação financeira relacionada a sua participação, que será voluntária.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, você deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente.

O sangue coletado, após processado, irá compor biorrepositório (será armazenado para fins de pesquisa), e poderá ser usado futuramente para estudos de polimorfismo (a exemplo do descrito nesse documento), em conjunto com as informações clínicas obtidas por meio de análise de prontuário médico. Não faz parte da metodologia do estudo o rastreamento do indivíduo doador do material e das informações.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Diêgo Madureira de Oliveira, na UnB, no telefone (61) 3107-8938, disponível inclusive para ligação a cobrar. Também é possível fazer contato pelo e-mail [dmadureira@unb.br](mailto:dmadureira@unb.br).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ceilândia (CEP/FCE) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-8434 ou do e-mail [cep.fce@gmail.com](mailto:cep.fce@gmail.com), horário de atendimento das 14h:00 às 18h:00, de segunda a sexta-feira. O CEP/FCE se localiza na Faculdade de Ceilândia, Sala AT07/66 – Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED) – Universidade de Brasília - Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília - DF. CEP: 72220-900.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor(a).

---

Nome / assinatura

---

Pesquisador Responsável Diêgo Madureira de Oliveira

Brasília, \_\_\_ de \_\_\_ de \_\_\_\_.

## ANEXO C – Voucher para coleta de sangue no Sabin



## VAUCHER PARA AUTORIZAÇÃO DE EXAMES – NAP

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

NOME DO PACIENTE:

DATA DE NASCIMENTO:

PESQUISA: ESTUDO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS AO GENE hTERT EM PACIENTES  
COM CÂNCER NO DISTRITO FEDERAL

PESQUISADOR: Dr. Diego Madureira de Oliveira (CRM 1059793)

Solicitação:

**Nome do Exame**

Coleta de tubo de sangue EDTA

**Código**

EDTANAP

Convênio: 3491 – BSB-IS NAP KATHERINE RODRIGUES

O tubo com o sangue poderá ser colhido em qualquer unidade do laboratório Sabin.

**Recepção: Por favor desconsidere a data de entrega do resultado, para essa pesquisa não há resultado. É coletado somente um tubo de sangue que será entregue ao pesquisador, para que os exames possam ser realizados na UnB. Nós do Sabin não iremos realizar exames, somente a coleta do tubo.**

**Mandar esse tubo separado aos cuidados de Evanuzia – Triagem escrito “Material pesquisa NAP – tubo EDTA)”**

**Guia deve ser mandada no envelope para Simone Lima - NAP**

Dúvidas: Simone Lima  
NAP  
(61) 3329-8000 (ramal 3217)  
e-mail: [simonelima@sabin.com.br](mailto:simonelima@sabin.com.br)

## ANEXO D – Parecer CEP/FS/UnB



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - UNB



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE hTERT COMO POTENCIAIS FATORES DE RISCO PARA CÂNCER EM PACIENTES DO DISTRITO FEDERAL

**Pesquisador:** Diêgo Madureira de Oliveira

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 66909022.0.0000.0030

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE SAÚDE - FS

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.938.851

**Apresentação do Projeto:**

Conforme documento "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2011180.pdf", postado em 02/03/2023:

"Desenho:

Este trabalho será conduzido por meio de estudo transversal com população constituída por indivíduos saudáveis atendidos no Hemocentro de Brasília que aceitarem participar do estudo. Serão utilizadas exclusivamente amostras da camada leucocitária residual (buffy coat) de sangue processado, quando houver, de participantes com idade igual ou superior a 40 anos que não reportarem diagnóstico de neoplasia. A idade, nesse caso, corresponde a mediana do grupo de pacientes estudados, o que garantirá maior sensibilidade na análise estatística. Os tubos contendo as amostras serão transportadas para o laboratório da Faculdade de Ceilândia acondicionados em caixa térmica com gelo para processamento, que consiste extração do DNA utilizando-se kit de extração convencional de DNA genômico segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído será diluído em água ultrapura e dividido em duas alíquotas que serão congeladas à -86°C. A região genômica de interesse será sequenciada e analisada quanto à presença de alterações. As amostras serão mantidas durante a execução do

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1947

**E-mail:** oepfsunb@gmail.com

## ANEXO E – TCLE Hemocentro



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

---

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**


---

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE hTERT COMO POTENCIAIS FATORES DE RISCO PARA CÂNCER EM PACIENTES DO DISTRITO FEDERAL, sob a responsabilidade do pesquisador *Diêgo Madureira de Oliveira*. O projeto trata-se de um estudo que visa à descoberta de características genéticas que possam estar associadas ao desenvolvimento do câncer. Para isso, serão estudadas amostras de DNA extraído a partir de sangue coletado de voluntários saudáveis.

O nosso objetivo é *investigar se algumas características do DNA podem aumentar o risco de câncer. Resumidamente, a análise de mutações em um gene conhecido como TERT em pacientes com câncer, e em pessoas saudáveis, como é o seu caso, nos permitirá saber se essas mutações ocorrem mais frequentemente nas pessoas doentes, o que facilitaria o diagnóstico precoce e aumentaria as chances de sucesso no tratamento oncológico.*

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não será divulgado, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio da autorização para que utilizemos o resíduo do processamento do sangue que está prestes a doar, e que seria descartado, para a análise do material genético ali disponível. Você também precisará informar sua idade, sexo, altura (se souber), peso (se souber) e histórico de câncer na família.

Esse é um estudo de genética, o que significa que teremos acesso ao seu DNA. Os testes, porém, serão realizados unicamente com o gene TERT, e os dados genéticos gerados são confidenciais e não serão repassados a terceiros em hipótese alguma. As

---

*Rubrica do participante/responsável legal*

Página 1 de 3

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FEPECS – E-mail: [comitedeetica.secretaria@gmail.com](mailto:comitedeetica.secretaria@gmail.com) – Telefone: (61) 2017 1145 – ramal 6878

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FEPECS – E-mail: [ceps@unb.br](mailto:ceps@unb.br) ou [cepsunb@gmail.com](mailto:cepsunb@gmail.com) – Telefone: (61) 3107 1947



amostras serão descartadas ao final do estudo e não poderão ser utilizadas para outras finalidades além das descritas nesse documento. No caso de alguma descoberta no seu sequenciamento genético que tenha relevância clínica (valor clínico ou repercussão na saúde), o(a) senhor(a) será devidamente comunicado sobre os achados pelo pesquisador responsável pela pesquisa (Diêgo Madureira de Oliveira).

Apesar de ser um procedimento seguro e sem complicações, a doação de sangue pode apresentar riscos relacionados a algumas reações adversas locais ou sistêmicas: sintomas locais decorrentes da inserção da agulha, como hematomas, punção arterial, irritação ou lesão de nervo, lesão de tendão, sangramento pós-doação, tromboflebite e alergias; hipovolemia; fadiga e sintomas subjetivos (tonturas, náuseas e palidez). Para minimizar essas situações há protocolos seguidos pelo Hemocentro de Brasília para preparo do paciente e a presença de profissional de saúde treinado e experiente, capaz de realizar uma coleta de sangue segura e de auxiliar no caso dessas situações adversas.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são relacionados ao acesso ao seu material genético e dados pessoais, como mencionado. Mas tais informações serão utilizadas unicamente para a finalidade do estudo. Se você aceitar participar, estará contribuindo para melhorar o entendimento sobre o câncer e sobre características identificáveis no sangue que poderão ajudar no tratamento precoce dos pacientes que sofrem com essa doença.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder, ou participar de qualquer procedimento e de qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). O seu tratamento seguirá de acordo com o previsto em protocolos da instituição, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário, caso não concorde ou desista de participar da pesquisa.

O(A) Senhor(a) pode pensar o tempo que for necessário se deseja ou não participar desta pesquisa, inclusive pode levar este documento para sua casa, para poder decidir.

As despesas relacionadas com a participação (ressarcimento) serão absorvidas integralmente pelo orçamento da pesquisa. No entanto, você não terá qualquer despesa se aceitar participar do estudo.

---

*Rubrica do participante/responsável legal*

Página 2 de 3



O(A) Senhor(a) tem direito a buscar indenização em caso de danos provocados pela pesquisa, ainda que sejam danos não previstos na mesma, porém a ela relacionados.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília e em revistas científicas especializadas podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do pesquisador.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor, entre em contato a qualquer hora para: Katherine de Souza Rodrigues ou Diêgo Madureira de Oliveira, na Universidade de Brasília (e-mail: [dmadureira@unb.br](mailto:dmadureira@unb.br)) e nos telefones (61) 98575 6904 ou (61) 98500 4932, disponível inclusive para ligação a cobrar.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS-SES/DF (CEP/FEPECS) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou aos direitos do participante da pesquisa podem ser encaminhadas ao CEP/FEPECS por e-mail: [comitedeetica.secretaria@gmail.com](mailto:comitedeetica.secretaria@gmail.com) ou por contato telefônico: (61) 2017 1145 ramal 6878 ou encaminhadas ao CEP/FS pelo telefone (61) 3107-1947 ou pelo e-mail [cepfs@unb.br](mailto:cepfs@unb.br) ou [cepfsunb@gmail.com](mailto:cepfsunb@gmail.com), horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará sob a responsabilidade do pesquisador Diêgo Madureira de Oliveira e a outra com o Senhor(a).

---

Participante da Pesquisa/Responsável Legal  
Nome e assinatura

---

Pesquisador Responsável  
Nome e assinatura

Brasília, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Página 3 de 3

## ANEXO F – Formulário para coleta de dados



## Formulário de coleta de dados

Projeto: ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE hTERT COMO POTENCIAIS FATORES DE RISCO PARA CÂNCER EM PACIENTES DO DISTRITO FEDERAL

Paciente: \_\_\_\_\_

Ficha projeto: \_\_\_\_\_

**Esse questionário tem o objetivo de coletar informações relevantes para o presente estudo sobre câncer.**

1- Sexo: \_\_\_\_\_

2- Idade: \_\_\_\_\_

3- Altura: \_\_\_\_\_

4- Peso: \_\_\_\_\_

5- Histórico de câncer na família: \_\_\_\_\_

## ANEXO G – Artigo submetido

**Breast Cancer Research and Treatment**  
**Gene polymorphisms and breast cancer risk, a review**  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BREA-D-23-01331
Full Title:	Gene polymorphisms and breast cancer risk, a review
Article Type:	Review
Keywords:	Breast cancer; breast cancer risk; polymorphisms; SNP
Corresponding Author:	Katherine de Souza Rodrigues Universidade de Brasília Asa Norte, DF BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Brasília
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Katherine de Souza Rodrigues, Master
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Katherine de Souza Rodrigues, Master Diêgo Madureira de Oliveira, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p><b>Objectives</b></p> <p>Breast Cancer (BC) susceptibility has been observed to potentially correlate with specific SNPs within certain populations. Investigating these SNPs offers a unique advantage as they represent inherent genetic traits of individuals, enabling access to this information at any point in time, even prior to a formal diagnosis of the disease (particularly in cases where patients have a familial history). This provides an opportunity for proactive measures. Hence, the primary objective of this study was to comprehensively review existing data concerning the links between polymorphisms and the risk of developing breast cancer.</p> <p><b>Methods</b></p> <p>We performed a review by selecting articles from Pubmed using the mesh Terms: polymorphism[title] OR polymorphisms[title] AND breast cancer risk[title], considering publications in the last 10 years.</p> <p><b>Results</b></p> <p>327 genes and over 1,900 SNPs were identified. The gene most frequently cited was MTHFR (16 articles), followed by the genes ESR1, GSTM1 and GSTT1. The gene that underwent the most extensive scrutiny for its polymorphisms was the ROR-<math>\alpha</math> gene, with 290 SNPs analyzed. Across most genes, the associations with breast cancer risk show significant discrepancies among the studies.</p> <p><b>Conclusion</b></p> <p>While the literature reports numerous noteworthy associations, conflicting outcomes are prevalent. Nevertheless, the substantial consensus among studies for certain polymorphisms suggests the potential for discovering novel genetic profiles linked to an elevated risk of breast cancer, while considering ethnic variations.</p>
Suggested Reviewers:	Nasrin Rezazadeh Kashan University of Medical Sciences

	<p>rezazadeh.nasrin2@gmail.com Reviewer with publications in the same area, demonstrating knowledge on the subject.</p> <p>Faezeh Ghasemi Arak University of Medical Sciences ghasemi_808@yahoo.com Reviewer with publications in the same area, demonstrating knowledge on the subject.</p> <p>Marwa Saied Alexandria University Faculty of Medicine marwahanafi@yahoo.co.uk Reviewer with publications in the same area, demonstrating knowledge on the subject.</p> <p>Kamlesh Guleria Guru Nanak Dev University guleria_k@yahoo.com Reviewer with publications in the same area, demonstrating knowledge on the subject.</p> <p>Luiza Breitenfeld UBI: Universidade da Beira Interior luiza@fcsaude.ubi.pt Reviewer with publications in the same area, demonstrating knowledge on the subject.</p>	
<b>Funding Information:</b>	<p>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance Code 001)</p>	<p>Rodrigues, Katherine de Souza Katherine de Souza Rodrigues</p>

## Title:

*Gene polymorphisms and breast cancer risk, a review*

Author 1 (Corresponding author): Katherine de Souza Rodrigues

Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - UnB (70910-900), Brasília, Distrito Federal, Brasil

E-mail: [katherine.souza.15@gmail.com](mailto:katherine.souza.15@gmail.com)

E-mail alternativo: [katherine.rodrigues@kroton.com.br](mailto:katherine.rodrigues@kroton.com.br)

Orcid: 0000-0003-0310-4545

Author 2: Diêgo Madureira de Oliveira

Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - UnB (70910-900), Brasília, Distrito Federal, Brasil

Orcid: 0000-0002-6044-1954

## Abstract

**Objectives:** Breast Cancer (BC) susceptibility has been observed to potentially correlate with specific SNPs within certain populations. Investigating these SNPs offers a unique advantage as they represent inherent genetic traits of individuals, enabling access to this information at any point in time, even prior to a formal diagnosis of the disease (particularly in cases where patients have a familial history). This provides an opportunity for proactive measures. Hence, the primary objective of this study was to comprehensively review existing data concerning the links between polymorphisms and the risk of developing breast cancer.

**Methods:** We performed a review by selecting articles from Pubmed using the mesh Terms: polymorphism[title] OR polymorphisms[title] AND breast cancer risk[title], considering publications in the last 10 years.

**Results:** 327 genes and over 1,900 SNPs were identified. The gene most frequently cited was MTHFR (16 articles), followed by the genes ESRI, GSTM1 and GSTT1. The gene that underwent the most extensive scrutiny for its polymorphisms was the ROR-a gene, with 290 SNPs analyzed. Across most genes, the associations with breast cancer risk show significant discrepancies among the studies.

**Conclusion:** While the literature reports numerous noteworthy associations, conflicting outcomes are prevalent. Nevertheless, the substantial consensus among studies for certain polymorphisms suggests the potential for discovering novel genetic profiles linked to an elevated risk of breast cancer, while considering ethnic variations.

## Keywords:

breast cancer; breast cancer risk; polymorphisms; SNP.

## List of abbreviations:

BC: breast cancer

SNP: single nucleotide polymorphism

DNA: deoxyribonucleic acid

RNA: ribonucleic acid

OR: odds ratio

95%CI: 95% confidence interval

## Introduction

Breast cancer (BC) is a multifactorial and polygenic disease and represents one of the most common causes of death in women, being the most frequent type of cancer in this population [1][2]. During the development of the disease, the occurrence of somatic genetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes is expected [3], which confer a specific susceptibility to BC for those who present certain genetic variations [4]. Some genetic loci are already known to be related to BC susceptibility, such as BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, ATM, BRIP1, CHEK2 and PALB2. They represent 15 to 20% of the genetic risk of BC [5].

Given that polymorphisms represent common genetic variances within particular populations, it's plausible that susceptibility to breast cancer could be associated with specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) [6]. Investigating these SNPs offers a unique advantage as they represent inherent genetic traits of individuals, enabling access to this information at any point in time, even prior to a formal diagnosis of the disease (particularly in cases where patients have a familial history). As stated, polymorphisms may be related to BC and the analysis of SNPs would assist in the discovery of biomarkers for prevention, anticipation of diagnosis and clinical management of BC [6]. Therefore, the aim of this study was to review existing data concerning the association between polymorphisms and the risk of developing BC.

In this review, we conducted article selection through PubMed searches using the following terms: "polymorphism[title] OR polymorphisms[title] AND breast cancer risk[title]" within the last decade, yielding a total of 329 articles. Articles that did not address the link between polymorphisms and risk for BC or were in a language other than English were excluded. After reading the titles, 307 articles were selected. After reading the abstracts, 80 articles were excluded. 227 articles were used in full for the review. More than 320 genes were cited. In our work we will address those most frequently studied.

## MTHFR gene

The gene that garnered the most attention in the studies was MTHFR, referenced in 16 articles. 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is one of the key enzymes in folate metabolism, which is ultimately involved in promoting the methylation of DNA, RNA and proteins [1,4,6]. The MTHFR gene is located on chromosome 1 (1p36.3) and has its coding region distributed across 11 exons [4,6]. Polymorphisms in the enzymes of genes that act in the folate pathway have a functional impact on metabolism [6]. Reduced MTHFR pathway activity may influence carcinogenesis by affecting gene regulation [3,4,6]. Furthermore, folate deficiency leads to the incorporation of uracil into DNA, causing damage and genetic instability that potentially contribute to tumor progression [6].

The most evaluated SNP in the MTHFR gene was rs1801133 (C677T), which results in the exchange of alanine to valine in the protein structure, reducing enzymatic activity and increasing thermolability [1,4,6]. Twelve articles demonstrated an association between this polymorphism and BC risk (Table 1). In a literature review that supported the case-control study, Kalemi et al found controversial studies regarding the influence of the MTHFR C677T polymorphism on the BC risk: the prevalence of the allele was significantly higher in Jewish women diagnosed with bilateral BC or combined breast and ovarian cancer; in a Scottish population, no association with the polymorphism and risk of BC was detected; and, in another work, the polymorphism increased the risk of BC in premenopausal but not postmenopausal women [3]. Petrone et al observed a relevant influence of the

MTHFR C677T polymorphism on BC risk in Caucasian and Asian populations [6]. The study by Hesari et al found the association of the MTHFR Ala222Val polymorphism with the risk of BC in Iranian women, with the T allele and the TT genotype correlated with an increased risk of BC [4]. On the other hand, a case-control study with individuals from northern Greece suggested that there is no association between MTHFR C677T and BC in this population, including in homozygotes [3]. In fact, 3 studies (one with a Greek population and two with a Chinese population) did not find a significant association [7-9].

Table 1 – Articles with the C677T polymorphism associated with BC risk

Reference	Population	Breast Cancer Risk AND genotype
[1]	Iran	T: OR= 2.31, 95%CI= 1.58-3.38, p< 0.0001. CT: OR= 3.04, 95%CI= 1.84-5.02, p< 0.0001; and TT: OR= 3.05, 95%CI= 1.22-7.59, p= 0.017
[10]	Meta-analysis	TT vs. CC: $p_{\text{heterogeneity}} < 0.001$ , OR= 1.141, 95%CI= 1.065-1.222, p<0.001; TT vs. CT: $p_{\text{heterogeneity}} < 0.001$ , OR= 1.085, 95%CI= 1.021-1.154, p= 0.009; TT+CT vs. CC: $p_{\text{heterogeneity}} < 0.001$ , OR= 1.040, 95%CI= 1.020-1.061, p<0.001; TT vs. CC+CT: $p_{\text{heterogeneity}} < 0.001$ , OR= 1.131, 95%CI= 1.052-1.215, p= 0.0478; T vs. C: $p_{\text{heterogeneity}} < 0.001$ , OR= 1.040, 95%CI= 1.009-1.071, p= 0.010
[11]	Meta-analysis	Fixed effects (OR= 1.14, 95%CI= 1.10-1.17) and random effects (OR= 1.10, 95%CI= 1.02-1.18)
[12]	Meta-analysis	T: OR= 1.07; asians: OR= 1.03; caucasians: OR= 1.13
[13]	Undescribed	TT: OR= 3.05, 95%CI= 1.17-8.87, p= 0.01
[14]	Meta-analysis	T vs. C: OR= 1.08, 95%CI= 1.03-1.13, p< 0.001; TT+CT vs. CC: OR= 1.06, 95%CI= 1.02-1.09, p<0.001; TT vs. CC: OR= 1.17, 95%CI= 1.06-1.28, p= 0.001; CT vs. CC: OR= 1.05, 95%CI= 1.01-1.08, p= 0.005; TT vs. CT+CC: OR= 1.12, 95%CI= 1.03-1.22, p= 0.005
[15]	Meta-analysis	TT vs. CC: OR= 1.51, 95%CI= 1.15-1.98, p<0.0001; T vs. C: OR= 1.16, 95%CI= 1.03-1.31, p <0.00001
[16]	Northwestern China	C/T: OR= 1.8, 95%CI= 1.1-3.2, p= 0.039; T/T: OR= 2.9, 95%CI= 1.2-7.2; p= 0.025; and C/T + T/T: OR= 1.9, 95%CI= 1.1-3.3, p= 0.019
[17]	China	TT vs. CC: OR= 1.60, 95%CI= 1.12-2.28, p= 0.001
[18]	China	TT: OR= 1.82, 95%CI= 1.24-2.97, p= 0.006; T: OR= 1.48, 95%CI= 1.15-1.78, p= 0.008
[19]	Meta-analysis	T vs. C: OR= 1.12, 95%CI= 1.02-1.23, p= 0.015; TT vs. CC: OR= 1.35, 95%CI= 1.10-1.67, p= 0.005; TT vs. CC/CT: OR= 1.37, 95%CI= 1.11-1.70, p= 0.004
[20]	Meta-analysis	T vs C: OR= 1.23, 95%CI= 1.13-1.37, p= 0.000; TT vs CC: OR= 1.38, 95%CI= 1.16-1.63, p= 0.0003; TT+CT vs CC: OR= 1.12, 95%CI= 1.01-1.23, p= 0.02

Legend: OR – odds ratio, 95%CI – 95% confidence interval

Another commonly investigated SNP was rs1801131 (A1298C), that leads to the substitution of glutamate with alanine, and consequently causing a moderate reduction in the enzymatic activity of MTHFR, albeit to a lesser extent than rs1801133 [19], as it does not produce a thermolabile protein [1,6]. We found 7 articles addressed this polymorphism, with divergent results: 4 works show no association (2 in China, 1 in Greece and another with an undescribed population) [7,8,13,19], one shows association with a lower risk (China) [17] and two show associations with higher risk (Iran and China) [1,21]. The literature also reports this inconsistency of results [19]. In the study by Karimian, Rezazadeh and Khamehchian, the CC genotype and the C Allele were associated with an increased risk of BC (CC: OR= 2.30, 95%CI= 1.09-4.85, p= 0.028; C Allele: OR= 1.47, 95% CI= 1.04-2.07, p= 0.029) [1]. Wang, Yang and Duan found a higher risk of BC among AC+CC genotype as compared to those carrying AA genotype (OR= 1.05 with 95%CI= 1.01-1.10) [21]. In the study by Lu et al, the MTHFR CACCAA and AGTCAC haplotypes (rs12121543-rs13306553-rs9651118-rs1801133-rs4846048-rs1801131) were associated with significantly reduced risk of BC (adjusted OR= 0.70, 95%CI= 0.58-0.86; adjusted OR= 0.57, 95%CI= 0.40-0.80) compared to the CATTAA haplotype [17].

Additional polymorphisms identified in this study, performed in a Chinese cohort, reduced the risk of developing BC: rs9651118 (CCxTT - adjusted OR= 0.65, 95%CI= 0.45–0.95) and rs13306553, rs12121543 and rs4846048 in haplotype analysis (CACCAA x AGTCAC [rs12121543-rs13306553-rs9651118-rs1801133-rs4846048-rs1801131] - adjusted OR= 0.70, 95%CI= 0.58–0.86; adjusted OR= 0.57, 95%CI= 0.40–0.80) [17].

An important factor to be considered when analyzing MTHFR gene polymorphisms related to cancer is the impact of folate intake on the disease, as in addition to the effect of the polymorphisms themselves, folate concentration is influenced by environmental and nutritional factors [1,3,6]. In some studies, folate intake has shown some protection against cancer risk; however, high folate concentration can lead to the opposite effect, demonstrating that folate intake operates a complex mechanism in tumor maintenance [1,22,23]. In fact, in patients with high folate levels, there may be a compensatory protection against decreased enzymatic activity resulting from the TT genotype of the C677T polymorphism (OR= 0.70, 95%CI= 0.40–1.23) [22]. This can be explained by the action of folate in retaining the MTHFR variant in the appropriate and functional three-dimensional form, stabilizing the thermolabile structure and counteracting the reduction in enzymatic activity [23]. However, this result may vary among genotypes and populations. Gao et al reported that dietary folate intake was inversely associated with BC risk for the CC and CT (rs1801133) genotypes, but this effect was not observed in the TT genotype, which showed a high OR independent of folate intake [23]. Additionally, intake of vitamin B6, B12 and methionine may also be related to the effect of MTHFR polymorphisms on BC risk [22].

Despite the large number of studies with the MTHFR gene, the results are diverse, probably due to the influence of the genetic background of the populations studied and the effect of nutritional aspects on the predictive role of polymorphisms. Nevertheless, numerous studies have highlighted substantial associations, indicating the potential of this gene for inclusion in molecular screening platforms.

#### ESR1 gene

Ten articles explored the ESR1 gene (of the estrogen receptor alpha - ER- $\alpha$ ), 1 review, 8 case-control and 1 case-control + Meta-analysis, involving the following populations: Khyber Pakhtunkhwa, Vietnamese, Iranian, Korean, Japanese and Chinese (4 articles). In total, 35 polymorphisms were examined, with the most extensive focus placed on rs2046210 and rs2234693, as highlighted in Table 2.

Table 2 – ESR1 gene polymorphisms and association with BC risk

References	SNP	Association (increased risk)	Association (decreased risk)	No association
[24–27]	rs2046210	[24]: A (OR= 2.42, 95%CI = 1.74-3.38, p<0.0001); GA (OR= 2.55, 95%CI= 1.62-4.03, p= 0.0001); AA (OR= 2.20, 95%CI= 1.12-4.34, p= 0.02) [25]: A (OR= 1.43, 95%CI= 1.14-1.78, p= 0.0015) [26]: OR= 1.20, p= 0.033 [27]: per allele OR=1.3, 95%CI= 1.11-1.70		
[24,28,29]	rs2234693 (PvuII / - 397T>C)	[29]: TT genotype and passive smoking (OR= 2.40, 95%CI= 1.27-4.53) in postmenopausal women	[28] meta-analysis: C (OR= 0.96, 95%CI= 0.92-0.99)	[24] and [28] – case control
[26,27]	rs3757318	[26]: OR= 1.30, p= 0.005 [27]: OR=1.33, 95%CI=		

			1.05-1.69	
1	[26,30]	rs3734805	[26]: OR= 1.28, p= 0.006	
2			[30]: OR= 1.36, 95%CI=	
3			1.01-1.82, p= 0.042	
4	[26]	rs9383951	OR= 0.69, p= 0.048	
5	[31]	rs2881766	OR= 1.40, 95%CI= 1.06-	
6			1.84, p= 0.02	
7	[31]	rs2077647	OR= 1.37, 95%CI= 1.05-	
8			1.79, p= 0.02	
9	[31]	rs926778	OR= 1.56, 95%CI= 1.19-	
10			2.05, p<0.0	
11	[31]	rs2273206	OR= 1.40, 95%CI= 1.08-	
12			1.82, p= 0.01	
13				OR= 0.76, 95%CI=
14	[31]	rs3798377		0.58-1.00, p = 0.05
15				- decreased the risk
16				in overall patients
17				
18	[32]	rs1062577 (3804T->A)	A allele: univariate and multivariate regression models (OR= 8.403 and 32.602, respectively)	
19				Case-control: G
20				allele OR adjusted
21				for age= 0.80,
22				95%CI= 0.66-0.97;
23				Meta-analysis: G
24	[28]	rs9340799 (Xbal/351A >G)		allele OR= 0.90,
25				95%CI= 0.82-1.00
26				
27				
28				
29		rs910416		
30		rs3798577		
31		rs2228480		
32		rs750686		
33		rs3020366		
34		rs6905370		
35		rs3020407		
36		rs726282		
37		rs3020405		
38		rs1884054		
39		rs1884051		
40	[31]	rs3020401		[31]
41		rs3020396		
42		rs3020394		
43		rs3020317		
44		rs3020390		
45		rs3020377		
46		rs3020314		
47		rs1801132		
48		rs712221		
49		rs9322331		
50		rs851982		
51		rs851984		

Legend: OR - odds ratio, 95%CI - 95% confidence interval, 24: case-control - Khyber Pakhtunkhwa, 25: case-control - Vietnamese; 26: case-control - northwestern China; 27: case-control - Japanese; 28: case-control and meta-analysis - China; 29: case-control - China; 30: case-control - Han population (China); 31: case-control - Korean; and 32: case-control - Iranian

Most breast tumors originate from luminal epithelial cells of the mammary gland [33,34]. The activation of estrogen receptors (ERs) in these cells triggers the transcription of genes related to cell proliferation, which makes ERs important in the process of carcinogenesis [5,33-35] and therefore

1 prognostic markers and targets for hormonal therapies [36]. Polymorphisms in the ER- $\alpha$  (ESR1) and ER- $\beta$  (ESR2) genes are related to increased or decreased risk of BC and are potential risk factors for ER+ BC [31].

2  
3  
4 The ESR1 gene is located on chromosome 6, at the q25.1-q25.2 locus [35,36], and contains eight  
5 exons, with at least 9 promoters that harbor multiple transcription factor binding sites [5]. Mutations in  
6 this gene are relatively uncommon in primary tumors. Nevertheless, it has been observed that a subset of  
7 tumors may develop resistance following hormonal treatment due to the recurrence of mutations that  
8 result in the constitutive activity of ER- $\alpha$  [36]. Regarding polymorphisms, Jahandoost, Farhangian and  
9 Abbasi described results of studies that found an association between ESR1 gene polymorphisms and BC  
10 risk in different populations: ER1002, rs2077647 and rs827421 in the Jewish population; rs2077647,  
11 rs1801132 and rs2228480 in Iran, rs851982 in the American population (e104062 C > T); rs851984,  
12 rs2881766, rs1801132 and rs910416 in Germany [33]. Despite the positive associations, studies show  
13 that the association can vary within the same population, making clear the role of ethnicity in determining  
14 the effects of polymorphisms on BC risk [33], which is in line with the results of the reported  
15 polymorphisms in our review. Although the majority of genotypes studied showed a significant  
16 association with increased risk, studies on the SNP rs2234693 (PvuII/-397T>C) presented discordant  
17 results: no association and association with greater and also lower risk.

18  
19  
20 It is important to consider ethnicity as well as whether the association is with a specific  
21 genotype, allele or subgroup. In the case of the PvuII SNP (Table 2) we observed a lack of association in  
22 case-control studies with Pakistani [24] and Chinese [28] populations; the lower BC risk was attributed to  
23 the C allele in a meta-analysis [28]; the association with BC risk was attributed to the GG genotype in a  
24 Chinese population but with specific subgroups: passive smoking and postmenopausal women [29]. The  
25 meta-analysis by Zhang et al described the association of PvuII with decreased BC risk in the allele  
26 model, homozygous model and recessive model (C vs. T: OR= 0.962, 95%CI= 0.933–0.992, p=0.012;  
27 CC vs. TT: OR= 0.911, 95%CI= 0.856–0.969, p= 0.003; CC vs. TT/CT: OR= 0.923, 95%CI= 0.874–  
28 0.975, p= 0.004) rather than the dominant model (CC/ CT vs. TT: OR= 0.970, 95%CI= 0.927–1.015, p=  
29 0.187) and subgroup analysis also showed association with lower cancer risk in Asians (homozygous and  
30 recessive model) [35].

31  
32  
33 The rs2046210 SNP was the most cited polymorphism and it was associated with BC risk in all  
34 populations studied (Pakistan, Vietnam, China and Japan). However, Jahandoost, Farhangian, and  
35 Abbasi did not find the same result in European-American and African-American populations. Another  
36 study corroborates this absence of association in the African-American population, but presents a  
37 significant result in the German population [33]. Jin, Zhang and Zhou's meta-analysis found a significant  
38 association in several analysis models (GG vs. GA + AA: dominant comparison, OR= 0.78, 95%CI=  
39 0.73–0.83, p<0.0001); AA vs GG +GA: recessive comparison, OR= 1.21, 95%CI=1.18–1.24, p<0.0001;  
40 GA vs. GG + AA: predominant comparison, OR= 1.12, 95%CI= 1.08–1.16, p<0.0001; and G versus A:  
41 allele comparison, OR= 0.86, 95%CI= 0.82–0.89, p<0.0001). In the subgroup analysis by ethnicity the  
42 association was found only for Asians and Caucasians [37]. A case-control study in the Egyptian  
43 population also found an association of rs2046210 with BC risk, with an increased risk when comparing  
44 AA + AG genotypes versus GG genotype. (OR = 3.27, 95%CI= 1.37-7.83, p= 0.0078) and on the A allele  
45 compared to the G allele (chi-square test, p<0.001, OR= 3, 3810, 95%CI= 1.85-6.17, p= 0.0001) [38].

46  
47  
48 Some SNPs were associated with a lower risk of BC, such as rs3798577 in a case-control study  
49 conducted in Korea (OR= 0.76, 95%CI= 0.58–1.00, p= 0.05) [31]. Another study, case-control and meta-  
50 analysis in a Chinese population, found in both approaches the association of the G allele of rs9340799  
51 with a reduced risk of cancer (case control: G allele with OR adjusted for age= 0.80, CI95%= 0.66-0.97;  
52 meta-analysis: G allele: OR= 0.90, 95%CI= 0.82-1.00) [28]. However, AL-Eitan et al found divergent  
53 results when studying the same polymorphisms in an Arab population from Jordan: the T allele and the  
54 TT genotype were correlated with the risk of BC (p= 0.024 and  $\chi^2= 5.033$ ; p= 0.047 and  $\chi^2= 6.076$ ,  
55 respectively), and there was also a correlation with the genetic models CT vs TT ( $\chi^2= 4.88$ ) and CC vs  
56 TT ( $\chi^2= 4.16$ ); for rs9340799, the correlation with BC was only with the GG vs AG genetic model ( $\chi^2=$   
57 4.29) [39]. The meta-analysis by Tan et al did not find any association of rs9340799 with the risk of BC,  
58 in the overall results, with the different genetic models, and even after stratification into subgroups by  
59 ethnicity, study quality and menopausal status [5].

60  
61  
62  
63  
64  
65

The discrepancies in results can be explained once more by genetic heterogeneity between different ethnicities, interaction between genes, linkage disequilibrium between SNP sites, environment and lifestyles, which contribute distinctly to tumorigenesis [35]. However, despite the divergent results, understanding the relationship between cancer and ER- $\alpha$  through studies of these SNPs expands knowledge of the key biological pathways involving this receptor, in addition to highlighting potential genetic profiles related to BC for each ethnicity [33].

#### GSTM1 and GSTT1 genes

Glutathione S-transferase (GST) is a Phase II enzyme that acts to protect cells against chemical injury through the conjugation of electrophilic molecules to glutathione in order to facilitate excretion [2,40]. This process prevents the accumulation of quinones and, consequently, the formation of DNA adducts with carcinogenic potential [2,41]. These enzymes are encoded by the GSTM1 gene (chromosome 1p13.3) and the GSTT1 gene (chromosome 22q11.2) [2,40,41]. In fact, polymorphisms associated with the encoding of these enzymes may play a role in sustaining the tumor. This is notably exemplified by null polymorphisms (null genotype) affecting the enzymes glutathione S-transferase Mu1 (GSTM1) and glutathione S-transferase Theta1 (GSTT1), wherein the homozygous genotype signifies the complete absence of the enzyme. We found nine articles that address the null polymorphism of the GSTM1 and GSTT1 genes. For GSTM1, only one article found no significant association with BC risk, in Mexicans. The other papers were meta-analyses (6) and case-control studies (2, with Indians and Mexicans). For GSTT1, associations were identified in 3 meta-analyses and 1 case-control study with Indians.

A case-control study in a north Indian population shows an example of GSTM1 polymorphism as risk factor for BC (OR= 2.231, 95%CI= 1.332–3.737,  $p= 0.002$ ), what was not true for genotype null of GSTT1 [42]. Another study, in a Philippine population, found no significant difference between the case and control groups for both polymorphisms and reported other studies with similar results, in Iranians, Lebanese, Pakistanis, Taiwanese, Icelanders, Caucasians and African-Americans [43]. Regarding GSTT1, a lack of association with null GSTT1 has been described in Dutch, Lebanese, Icelandic, Iranian, Mexican, Caucasian and African American women [43]. The association of these polymorphisms with BC risk was significant in studies with combined null genotypes of GSTM1 and GSTT1 (OR= 10.80, 95%CI= 1.16–100.43) in Mizoram - Northeast India [44], GSTM1 in Brazilians (OR= 2.4, 95%CI= 1.1–5.6,  $p=0.04$ ) [45], 60% increased risk (95%CI= 1.0–2.5) in Caucasians whose GSTM1 or GSTT1 gene was deleted [46], GSTM1 in Dutch (OR=1.46, 95%CI= 1.02–2.09) [47], and in Ghanaians with GSTT1 (OR=2.84, 95%CI= 1.52–5.29,  $p= 0.001$ ) and combination of null GSTT1 and present GSTM1 (OR= 3.02, 95%CI= 1.61–5.66,  $p<0.001$ ) [48].

Considering the division into subgroups, in premenopausal Indian women a protective effect of null GSTM1 (OR= 0.58, 95%CI= 0.38–0.90,  $p= 0.014$ ) [2] was reported, and in Portuguese women advanced age was associated in the following ways: null GSTT1 in patients with  $\geq 50$  years ( $p= 0.021$ ), GSTM1 and GSTT1 with a bidirectional association with age ( $p= 0.018$ ) [41].

Despite the contradictory results, the biological role of GSTM1 and GSTT1 in cancer keep these genes as targets for genetic studies on BC, highlighting the fact that the studies about pathways involving the respective enzymes must take polymorphisms and ethnicity into account.

#### Other genes

Another 323 genes were reported in our review, involving more than 1900 SNPs. Some works present a large-scale approach. One study, for example, investigated 585 SNPs in 68 genes related to the metabolism of xenobiotics in a French population, with 1,125 cases and 1,172 controls, and found an association of 16 SNPs with BC risk: rs1789888 (ADH1B), rs1229980 (ADH1C), rs12049503 (AKR1A1) 68 (CYP2F1), rs4149197 (MGST1), rs10918228 (MGST3), rs8190871 (NAT1) and rs1799929 (NAT2) [49]. Furthermore, two panels were used to investigate polygenic risk through a combination of SNPs and demographic density to evaluate the panel's predictive factor. In both cases there were significant results: SNP143 (unadjusted IQ-OR= 2.12, 95%CI= 1.75–2.42; adjusted= 2.06,

95%CI= 1.75–2.42) [50] and SNP18 (unadjusted IQ-OR= 1.56, 95%CI= 1.38-1.77; adjusted= 1.53, 95%CI= 1.35-1.74) [51].

When excluding cases from panels containing SNPs, the genes that underwent the most extensive SNP assessments were: ROR- $\alpha$  (290 SNPs), UGT1A (68 SNPs), NPAS2 (64 SNPs), ROR- $\beta$  (36 SNPs), CYP19A1 (31 SNPs), UGT2A1 (31 SNPs), ARNTL (24 SNPs), PARP1 (23 SNPs), CUL1 (23 SNPs), MGST2 (22 SNPs), CLOCK (21 SNPs), VEGF (18 SNPs), AKR1C2 (18 SNPs), CYP2C8 (18 SNPs), CYP2C9 (18 SNPs), VDR (17 SNPs), CASP8 (16 SNPs), PER3 (16 SNPs), LincRNAs (16 SNPs), TDG (SNPs), CYP2B6 (15 SNPs), MGST3 (15 SNPs), CYP2C19 (15 SNPs), AKR1C4 (14 SNPs), EPHX1 (14 SNPs), RORC (14 SNPs), COMT (13 SNPs), CRY2 (13 SNPs), BTRC (13 SNPs), CYP2C18 (13 SNPs), XRCC1 (12 SNPs), PER2 (12 SNPs), CYP2S1 (12 SNPs), CYP24A1 (11 SNPs), IGF1 (11 SNPs), ADH1B (11 SNPs), ADH7 (11 SNPs), GSTZ1 (11 SNPs), NAT1 (11 SNPs), NAT2 (11 SNPs), NEIL2 (11 SNPs), CYB5R (10 SNPs), microRNAs (10 SNPs), ADH1C (10 SNPs), CYP2E1 (10 SNPs), GSTA4 (10 SNPs), PARP2 (10 SNPs) and MGST1 (10 SNPs). Among these genes, those that showed any association with BC risk are listed in Table 3. The list of other genes and SNPs found in the research are available in Supplementary Information, in Supplementary Table 1 (ST1).

Table 3 – Genes with the highest number of reported SNPs and association with BC risk, in meta-analysis and case-control studies

Gene	Polymorphism			References and type of study	
	Associated with higher risk	Associated with lower risk	No significant association		
ROR- $\alpha$ (290 SNPs)	rs12914272 (1) rs1482057 (1)		288 SNPs*	[52,53] Case-control	
CYP19A1 (30 SNPs)	rs7176005 (1) rs11856927 (1) rs700518 (1)		rs6495497 (2) rs700519 (1) rs4646 (2) rs2414099 (1) rs2445762 (1) rs2470144 (1) rs2470152 (1) rs2470158 (1) rs2899472 (1) rs3751591 (1) rs4275794 (1) rs10046(2) rs60271534 (1)	rs12908980 (1) rs12591359 (1) rs17523880 (1) rs17601876 (1) rs17703883 (1) rs1902584 (1) rs1961177 (1) rs7172156 (1) rs7174997 (1) rs727479 (1) rs730154 (1) rs8025191 (1) rs10459592 (1)	[54–56] Case-control
CLOCK (21 SNPs)	rs11932595 (1)*	rs3749474 (2)	rs17776421 (1) rs1048004 (2) rs11133389 (1) rs11133376 (1) rs10462032 (1) rs17085763 (1) rs3792603 (1) rs11133391 (2) rs3805151 (1) rs2035691 (1)	rs11932595 (1)* rs10462028 (1) rs1801260 (3) rs11133373 (2) rs13102385 (2) rs7698022 (3) rs6850524 (1) rs6554281 (1) rs17777927 (1) rs3805147 (1)	[52,53,57] 57: meta-analysis Others: case-control
VEGF (18 SNPs)	rs833061 (1)* rs699947 (2)* rs35569394 (1) rs13207351 (1) rs1570360 (1) rs2010963 (2)* rs3025039 (1)*	rs3025039 (2)* rs79469752 (1) rs28357093 (1)	rs3025039 (1)* rs2010963 (1)* rs833061 (1)* rs35569394 (1) rs699947 (1)* rs833062 (1) rs59260042 (1)	-160 C/T (1) rs833061 (1) rs1570360 (1) rs10434 (1) rs25648 (1)	[58–63] 61: meta-analysis Others: case-control
CYP2C8 (18 SNPs)	rs11572172		rs10509681 rs1058930 rs1058932 rs11188147 rs11572126 rs11572127 rs1341163 rs1341164 rs1557044	rs1934952 rs1934953 rs1934954 rs1934980 rs3752988 rs6583967 rs6583968 rs7909236	[49] Case-control
VDR (17 SNPs)	rs7975232 (2)* rs1544410 (2)* rs2228570 (3)*	rs2544038 (1) rs1544410 (1)* rs731236 (1)*	rs2071358 (1) rs2239181 (1) rs2239182 (1)	rs11168287 (1) rs11168314 (1) rs1544410 (4)*	[64–71] 68, 70 and 71:

1		rs731236 (2)*	rs2408876 (1) rs3782905 (1) rs7299460 (1) rs7975232 (3)* rs10875694 (1)	rs10735810 (1) rs2228570 (1)* poly-A repeat (1) rs731236 (3)*	meta-analysis Others: case-control
2					
3					
4		rs2293554 (1) rs11899004 (1) rs3769825 (1) rs6723097 (1) rs6736233 (1) rs1045494 (1) rs1045485 (1)*	rs1045485 (2)* rs3834129 (1)	rs12693932 (1) rs6745051 (1) rs1861270 (1) rs1035140 (1) rs700636 (1) rs11679181 (1) rs1045485 (2)*^	[27,72-77] 73, 76 and 77: meta-analysis Others: case-control
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					
65					

		rs1614972	rs3846448	
		rs1693482		
1	rs743535	rs2031920	rs6413421	[49]
2		rs2070674	rs8192772	
3	CYP2E1 (10	rs3813867	rs915908	
4	SNPs)	rs6413419	rs9418990	Case-control
5		rs6413420		
6	rs3756980	rs13197674	rs316129	
7		rs16883343	rs367836	[49]
8	GSTA4 (10 SNPs)	rs17615213	rs378775	
9		rs1802061	rs7496	Case-control
10		rs2274760		
11	rs878157	rs7159947	rs3093921	
12		rs2297616	rs878156	[84]
13	PARP2 (10 SNPs)	rs1760921	rs3093939	
14		rs1760920	rs3093942	Case-control
15		rs3093904		
16	rs4149197	rs1024839	rs4149205	
17		rs1828682	rs4149208	[49]
18	MGST1 (10 SNPs)	rs2075237	rs9332908	
19		rs3815566	rs9332952	Case-control
20		rs3844373		

**Legend:**

(n): number of articles; #: the remaining 288 SNPs are listed in ST1; \*: SNP with more than one associative result; ^: excluded from statistical analyzes or not detected in the study population

Here are some additional examples that deserve attention: The AA genotype and the A allele of rs699947, in the VEGF gene, were associated with the risk of BC in North Indians (AA: OR= 2.87, 95%CI= 1.61-5.10, p= 0.0003; A: OR= 1.65, 95%CI= 1.25-2.18, p= 0.0004) [59]. The same association was found in a study with Iranians (AA vs. CC: OR= 2.12, 95%CI= 1.14-3.93, p= 0.021; A vs. C: OR= 1.47, 95%CI= 1.12-1.92, p= 0.005) [58]. Other genotypes of the same polymorphism and other SNPs in the same gene were also associated with BC risk, as shown in Table 3. Regarding the SNP rs2228570 of the VDR gene, the ff genotype was associated with the risk of BC in 3 studies: ff vs. Ff+FF with OR= 1.09 (95%CI= 1.02-1.16, p= 0.007) in a meta-analysis [68], ff vs. FF with OR= 1.71 (95%CI= 1.21-2.43) in a case-control in Kazakhstan [69] and ff vs. FF with OR= 1.95 (95%CI= 1.66-2.29) in another meta-analysis, which also found an association for the f allele (f vs. F: OR= 1.19, 95%CI= 1.03-1.36) and in subgroup Caucasian (f vs. F: OR= 1.35, 95%CI= 1.14-1.59; ff vs. FF: OR= 2.18, 95%CI= 1.86-2.54; ff vs. FF+Ff: OR= 1.16, 95%CI= 1.03-1.30) [71]. Finally, the SNP rs1045485 of CASP8 gene was associated with BC risk in a population of European ancestry (OR= 1.29, 95%CI= 1.02-1.64, p= 0.035) [75]. In two other studies, this polymorphism was associated with a lower risk of BC [72,73]: for CC genotype (OR= 0.52, 95%CI= 0.30-0.90) in a case-control in Iran [72] and global risk (OR= 0.89, 95%CI= 0.86-0.92) and in subgroups by populations: United Kingdom (OR= 0.89, 95%CI= 0.84-0.95), Germany (OR= 0.85, 95%CI= 0.75-0.97) and Poland (OR= 0.82, 95%CI= 0.72-0.93) in a meta-analysis [73].

### Conclusion

Our review has unveiled the extensive body of research exploring polymorphisms associated with breast cancer risk. More than 325 genes and 1900 SNPs were scrutinized. Notably, the most frequently studied gene was MTHFR, with a particular focus on the SNP rs1801133 (C677T). The gene ROR-a took the lead in terms of SNP investigations, with a remarkable count of 290 SNPs analyzed. Many conflicting results were found, highlighting the imperative consideration of factors such as ethnicity and other variables affecting the pathways associated with these genes to ensure accurate result interpretation. Nonetheless, the wealth of studies showing significant results, many of which are congruent, indicates the potential for identifying genetic profiles linked to an elevated BC risk. This underlines the importance of conducting further studies of a similar nature to advance our comprehension of the impact of genetic polymorphisms on this disease.

### Acknowledgments

We acknowledge the Graduate Program in Health Science at the University of Brasilia – Brazil for their support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

#### References

1. Karimian M, Rezazadeh N, Khamehchian T (2020) Association analysis of methylenetetrahydrofolate reductase common gene polymorphisms with breast cancer risk in an Iranian population: A case-control study and a stratified analysis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 21:2709–2714. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.9.2709>
2. Rajagopal T, Seshachalam A, Rathnam KK, Jothi A, Talluri S, Venkatabalasubramanian S, et al (2021) Impact of xenobiotic-metabolizing gene polymorphisms on breast cancer risk in South Indian women. *Breast Cancer Res. Treat.* 186:823–837. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-06028-z>
3. Kalemli TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT, Kotsis A (2005) The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Lett.* 222:57–65. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.025>
4. Hesari A, Maleksabet A, Tirkani AN, Ghazizadeh H, Iranifar E, Mohagheg F, et al (2019) Evaluation of the two polymorphisms rs1801133 in MTHFR and rs10811661 in CDKN2A/B in breast cancer. *J. Cell. Biochem.* 120:2090–2097. <https://doi.org/10.1002/jcb.27517>
5. Tan SC, Low TY, Mohamad Hanif EA, Sharzehan MAK, Kord-Varkaneh H, Islam MA (2021) The rs9340799 polymorphism of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene and its association with breast cancer susceptibility. *Sci. Rep.* 11:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97935-8>
6. Petrone I, Bernardo PS, Santos EC dos, Abdelhay E (2021) MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms in Breast Cancer, Gliomas and Gastric Cancer: A Review. *Genes (Basel)* 12:587. <https://doi.org/10.3390/genes12040587>
7. Luo WP, Li B, Lin FY, Yan B, Du YF, Mo XF, et al (2016) Joint effects of folate intake and one-carbon-metabolizing genetic polymorphisms on breast cancer risk: A case-control study in China. *Sci. Rep.* 6:1–11. <http://dx.doi.org/10.1038/srep29555>
8. Kakkoura MG, Demetriou CA, Loizidou MA, Loucaides G, Neophytou I, Marcou Y, et al (2015) Single-nucleotide polymorphisms in one-carbon metabolism genes, Mediterranean diet and breast cancer risk: a case-control study in the Greek-Cypriot female population. *Genes Nutr.* 10:1–11. <https://doi.org/10.1007/s12263-015-0453-7>
9. Xi J, Su Y, Beeghly Fadiel A, Lin Y, Su F-X, Jia W-H, et al (2014) Association of physical activity and polymorphisms in FGFR2 and DNA methylation related genes with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol.* 38:708–714. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.09.002>
10. Zhang Y, Jia H, Wang S, Jiang D (2017) Cumulative review and meta-analyses on the association between MTHFR rs1801133 polymorphism and breast cancer risk: a pooled analysis of 83 studies with 74,019 participants. *Minerva Med.* 108:57–73. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.16.04759-5>
11. Naushad SM, Divya C, Janaki Ramaiah M, Hussain T, Alrokayan SA, Kutala VK (2016) Population-level diversity in the association of genetic polymorphisms of one-carbon metabolism with breast cancer risk. *J. Community Genet.* 7:279–290. <http://dx.doi.org/10.1007/s12687-016-0277-1>
12. Yan W, Zhang Y, Zhao E, Zhang S (2016) Association between the MTHFR C677T Polymorphism and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of 23 Case-Control Studies. *Breast J.* 22:593–594. <https://doi.org/10.1111/tbj.12639>
13. Zhang XF, Liu T, Li Y, Li S (2015) Association between MTHFR 677C/T and 1298A/C gene polymorphisms and breast cancer risk. *Genet. Mol. Res.* 14:16425–16430.

<https://doi.org/10.4238/2015.december.9.12>

14. Kumar P, Yadav U, Rai V (2015) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and breast cancer risk: Evidence for genetic susceptibility. *Meta Gene* 6:72–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2015.08.008>
15. Wang Y, Yang H, Gao H, Wang H (2015) The association between methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphisms and breast cancer risk in Chinese population. *Tumor Biol.* 36:9153–9158. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3321-6>
16. López-Cortés A, Echeverría C, Oña-Cisneros F, Sánchez ME, Herrera C, Cabrera-Andrade A, et al (2015) Breast cancer risk associated with gene expression and genotype polymorphisms of the folate-metabolizing MTHFR gene: a case-control study in a high altitude Ecuadorian mestizo population. *Tumour Biol.* 36:6451–6461. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3335-0>
17. Lu Q, Jiang K, Li Q, Ji Y-J, Chen W-L, Xue X-H (2015) Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer risk and prognosis in a Chinese population. *Tumor Biol.* 36:3757–3762. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-3016-4>
18. Jiang-Hua Q, De-Chuang J, Zhen-Duo L, Shu-de C, Zhenzhen L (2014) Association of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms with breast cancer risk and interaction with folate, vitamin B6, and vitamin B 12 intakes. *Tumor Biol.* 35:11895–11901. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2456-1>
19. Liang H, Yan Y, Li T, Li R, Li M, Li S, et al (2014) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer risk in Chinese population: A meta-analysis of 22 case-control studies. *Tumor Biol.* 35:1695–1701. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1234-9>
20. Rai V (2014) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and breast cancer risk in asian populations. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 15:5853–5860. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.14.5853>
21. Wang Y, Yang H, Duan G (2015) MTHFR gene A1298C polymorphisms are associated with breast cancer risk among Chinese population: Evidence based on an updated cumulative meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8:20146–20156.
22. Shrubsole MJ, Gao YT, Cai Q, Shu XO, Dai Q, Hébert JR, et al (2004) MTHFR Polymorphisms, Dietary Folate Intake, and Breast Cancer Risk: Results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13:190–196. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-03-0273>
23. Gao CM, Tang JH, Cao HX, Ding JH, Wu JZ, Wang J, et al (2009) MTHFR polymorphisms, dietary folate intake and breast cancer risk in Chinese women. *J. Hum. Genet.* 54:414–418. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.57>
24. Shahzad S, Khan NU, Sombal W, Shah RU, Khan AU, Iqbal A, et al (2023) Estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphism (rs2234693 and rs2046210) with breast cancer risk in pashtun population of Khyber Pakhtunkhwa. *Mol. Biol. Rep.* 50:2445–2451. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08198-z>
25. Thanh NTN, Lan NTT, Phat PT, Giang NDT, Hue NT (2018) Two polymorphisms, rs2046210 and rs3803662, are associated with breast cancer risk in a vietnamese case-control cohort. *Genes Genet. Syst.* 93:101–109. <https://doi.org/10.1266/ggs.17-00053>
26. Zhou L, He N, Feng T, Geng T, Jin T, Chen C (2015) Association of five single nucleotide polymorphisms at 6q25.1 with breast cancer risk in northwestern China. *Am. J. Cancer Res.* 5:2467–2475.
27. Mizoo T, Taira N, Nishiyama K, Nogami T, Iwamoto T, Motoki T, et al (2013) Effects of lifestyle and single nucleotide polymorphisms on breast cancer risk: a case-control study in Japanese women. *BMC Cancer* 13:565. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-565>
28. Lu H, Chen D, Hu LP, Zhou LL, Xu HY, Bai YH, et al (2013) Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk: A case-control study with meta-analysis combined. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 14:6743–6749. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6743>

29. Tang L-Y, Chen L-J, Qi M-L, Su Y, Su F-X, Lin Y, et al (2013) Effects of passive smoking on breast cancer risk in pre/post-menopausal women as modified by polymorphisms of PARP1 and ESR1. *Gene* 524:84–89. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.064>
30. Xia P, Jin T, Geng T, Sun T, Li X, Dang C, et al (2014) Polymorphisms in ESR1 and FLJ43663 are associated with breast cancer risk in the Han population. *Tumour Biol.* 35:2187–2190. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1289-7>
31. Son BH, Kim MK, Yun YM, Kim HJ, Yu JH, Ko BS, et al (2015) Genetic polymorphism of ESR1 rs2881766 increases breast cancer risk in Korean women. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141:633–645. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1849-2>
32. Dehghan Z, Sadeghi S, Tabatabaieian H, Ghaedi K, Azadeh M, Fazilati M, et al (2017) ESR1 single nucleotide polymorphism rs1062577 (c.\*3804T>A) alters the susceptibility of breast cancer risk in Iranian population. *Gene* 611:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.02.016>
33. Jahandoost S, Farhangian P, Abbasi S (2017) The Effects of Sex Protein Receptors and Sex Steroid Hormone Gene Polymorphisms on Breast Cancer Risk. *J. Natl. Med. Assoc.* 109:126–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnma.2017.02.003>
34. Hsiao WC, Young KC, Lin SL, Lin PW (2004) Estrogen receptor- $\alpha$  polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: A case-control study. *Breast Cancer Res.* 6:R180. <https://doi.org/10.1186/bcr770>
35. Porras L, Ismail H, Mader S (2021) Positive regulation of estrogen receptor alpha in breast tumorigenesis. *Cells* 10:2966. <https://doi.org/10.3390/cells10112966>
36. Zhang ZL, Zhang CZ, Li Y, Zhao ZH, Yang SE (2018) Association between ER $\alpha$  gene Pvu II polymorphism and breast cancer susceptibility. *Medicine (Baltimore)* 97:e0317. <https://doi.org/10.1097/2FMD.00000000000010317>
37. Jin T feng, Zhang W ting, Zhou Z feng (2019) The 6q25.1 rs2046210 polymorphism is associated with an elevated susceptibility to breast cancer: A meta-analysis of 261,703 subjects. *Mol. Genet. Genomic Med.* 7:e553.
38. Saied MH, Rizk MM, El Sayed NAA, Motafa SOA, Marzouk S, Fayed H (2022) Sequencing of Chromosomal Locus 6q25.1 Revealed Two Significant SNPs rs2046210 and rs2046211 Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study in Egyptian Women. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 23:1359–1364. <https://doi.org/10.31557/2FAPJCP.2022.23.4.1359>
39. Al-eitan LN, Rababah DM, Alghamdi MA, Khasawneh RH (2019) Association between ESR1, ESR2, HER2, UGT1A4, and UGT2B7 polymorphisms and breast Cancer in Jordan: a case-control study. *BMC Cancer* 19:1257. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6490-7>
40. Miao LF, Wang XY, Ye XH, Cui MS, He XF (2019) Combined effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on breast cancer risk: A MOOSE-compliant meta-analysis and false-positive report probabilities test. *Medicine (Baltimore)* 98:e14333. <https://doi.org/10.1097/2FMD.00000000000014333>
41. Almeida M, Soares M, Fonseca-Moutinho J, Ramalhinho AC, Breitenfeld L (2021) Influence of estrogenic metabolic pathway genes polymorphisms on postmenopausal breast cancer risk. *Pharmaceuticals (Basel)* 14:94. <https://doi.org/10.3390/ph14020094>
42. Gautam P, Feroz Z, Tiwari S, Vijayaraghavalu S, Shukla GC, Kumar M (2022) Investigating the Role of Glutathione S-Transferase Genes, Histopathological and Molecular Subtypes, Gene-Gene Interaction and Its Susceptibility to Breast Carcinoma in Ethnic North-Indian Population. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 23:3481–3490. <https://doi.org/10.31557/2FAPJCP.2022.23.10.3481>
43. Kalacas NA, Garcia JA, Ortin TS, Valdez A, Fellizar A, Ramos MC, et al (2019) GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and breast cancer risk in selected Filipino cases. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 20:529–535. <https://doi.org/10.31557/apjcp.2019.20.2.529>
44. Kimi L, Ghatak S, Yadav RP, Chhuani L, Lallawmzuali D, Pautu JL, et al (2016) Relevance of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Gene Polymorphism to Breast Cancer Susceptibility in Mizoram Population, Northeast India. *Biochem. Genet.* 54:41–49. <https://doi.org/10.1007/s10528-015->

9698-5

- 1 45. Possuelo LG, Peraça CF, Eisenhardt MF, Dotto ML, Cappelletti L, Foletto E, et al (2013)  
2 Polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes in breast cancer susceptibility: a case-control study.  
3 *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 35:569–574. <https://doi.org/10.1590/s0100-72032013001200007>  
4
- 5 46. Zheng W, Wen W-Q, Gustafson DR, Gross M, Cerhan JR, Folsom AR (2002) GSTM1 and  
6 GSTT1 polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* 74:9–  
7 16. <https://doi.org/10.1023/A:1016005100958>  
8
- 9 47. van der Hel OL, Peeters PHM, Hein DW, Doll MA, Grobbee DE, Ocké M, et al (2004) GSTM1  
10 null genotype, red meat consumption and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes*  
11 *Control* 15:295–303. <https://doi.org/10.1023/b:caco.0000024255.16305.f4>  
12
- 13 48. Tagoe EA, Arko-Boham B, Adjorogbe B, Aryee NA, Adadey SM, Quaye O, et al (2017)  
14 Glutathione S-Transferase T1 and M1 Gene Polymorphisms among Breast Cancer Susceptible  
15 Ghanaians. *Clinical-Invastigation* 7:119–125.
- 16 49. Berrandou T, Mulot C, Cordina-Duverger E, Arveux P, Laurent-Puig P, Truong T, et al (2019)  
17 Association of breast cancer risk with polymorphisms in genes involved in the metabolism of  
18 xenobiotics and interaction with tobacco smoking: A gene-set analysis. *Int. J. Cancer.* 144:1896–  
19 1908. <https://doi.org/10.1002/ijc.31917>  
20
- 21 50. Brentmall AR, van Veen EM, Harkness EF, Rafiq S, Byers H, Astley SM, et al (2020) A case-  
22 control evaluation of 143 single nucleotide polymorphisms for breast cancer risk stratification  
23 with classical factors and mammographic density. *Int. J. Cancer.* 146:2122–2129.  
24 <https://doi.org/10.1002/ijc.32541>  
25
- 26 51. van Veen EM, Brentmall AR, Byers H, Harkness EF, Astley SM, Sampson S, et al (2018) Use of  
27 Single-Nucleotide Polymorphisms and Mammographic Density Plus Classic Risk Factors for  
28 Breast Cancer Risk Prediction. *JAMA Oncol.* 4:476–482.  
29 <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4881>  
30
- 31 52. Truong T, Liquet B, Menegaux F, Plancoulaine S, Laurent-Puig P, Mulot C, et al (2014) Breast  
32 cancer risk, nightwork, and circadian clock gene polymorphisms. *Endocr. Relat. Cancer* 21:629–  
33 638. <https://doi.org/10.1530/erc-14-0121>  
34
- 35 53. Zienolddiny S, Haugen A, Lie JAS, Kjuus H, Anmarkrud KH, Kjærheim K (2013) Analysis of  
36 polymorphisms in the circadian-related genes and breast cancer risk in Norwegian nurses working  
37 night shifts. *Breast Cancer Res.* 15:R53. <https://doi.org/10.1186/bcr3445>  
38
- 39 54. Al-Eitan LN, Rababa H DM, Alghamdi MA, Khasawneh RH (2019) Association of CYP gene  
40 polymorphisms with breast cancer risk and prognostic factors in the Jordanian population. *BMC*  
41 *Med. Genet.* 20:148. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0884-x>  
42
- 43 55. Ghisari M, Eiberg H, Long M, Bonefeld-Jørgensen EC (2014) Polymorphisms in Phase I and  
44 Phase II genes and breast cancer risk and relations to persistent organic pollutant exposure: A  
45 case-control study in Inuit women. *Environ Health* 13:19. <https://doi.org/10.1186/1476-069x-13-19>  
46
- 47 56. Boone SD, Baumgartner KB, Baumgartner RN, Connor AE, Pinkston CM, Rai SN, et al (2014)  
48 Associations between CYP19A1 polymorphisms, Native American ancestry, and breast cancer  
49 risk and mortality: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Cancer Causes Control* 25:1461–  
50 1471. <https://doi.org/10.1007%2Fs10552-014-0448-5>  
51
- 52 57. Shi Y, Wu L, Ji X, Li Y, Zhang Z (2023) Relationship Between Breast Cancer Risk and  
53 Polymorphisms in CLOCK Gene: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biochem. Genet.*  
54 <https://doi.org/10.1007/s10528-023-10372-2>  
55
- 56 58. Rezaei M, Hashemi M, Sanaei S, Mashhadi MA, Taheri M (2016) Association between vascular  
57 endothelial growth factor gene polymorphisms with breast cancer risk in an Iranian population.  
58 *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 10:85–91. <https://doi.org/10.4137/bcbr.s39649>  
59
- 60 59. Kapahi R, Guleria K, Sambyal V, Manjari M, Sudan M, Uppal MS, et al (2015) Association of  
61 VEGF and VEGFR1 polymorphisms with breast cancer risk in North Indians. *Tumour Biol.*  
62  
63  
64  
65

36:4223–4234. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3059-1>

- 1  
2 60. Kapahi R, Guleria K, Sambyal V, Manjari M, Sudan M, Uppal MS, et al (2014) Vascular  
3 endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and breast cancer risk in Punjabi  
4 population from North West India. *Tumour Biol.* 35:11171–11181.  
5 <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2404-0>
- 6 61. Yan Y, Liang H, Li T, Guo S, Li M, Li S, et al (2014) Vascular endothelial growth factor  
7 +936C/T polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis of 13 case-control studies.  
8 *Tumor Biol.* 35:2687–2692. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2404-0>
- 9 62. Sa-Nguanraksa D, Chuangsuwanich T, Pongprutipan T, Kummalue T, Rojananin S,  
10 Ratanawichitrasin A, et al (2013) Vascular endothelial growth factor -634G/C polymorphism is  
11 associated with increased breast cancer risk and aggressiveness. *Mol. Med. Rep.* 8:1242–1250.  
12 <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1607>
- 13 63. Luo T, Chen L, He P, Hu QC, Zhong XR, Sun Y, et al (2013) Vascular endothelial growth factor  
14 (VEGF) gene polymorphisms and breast cancer risk in a Chinese population. *Asian Pacific J.*  
15 *Cancer Prev.* 14:2433–2437. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.4.2433>
- 16 64. El-Shorbagy HM, Mahmoud NH, Sabet S (2017) Association of vitamin D receptor gene  
17 polymorphisms with breast cancer risk in an Egyptian population. *Tumor Biol.* 39:1–9.  
18 <https://doi.org/10.1177/1010428317727738>
- 19 65. Rashid MU, Muzaffar M, Khan FA, Kabisch M, Muhammad N, Faiz S, et al (2015) Association  
20 between the bsmi polymorphism in the Vitamin D receptor gene and breast cancer risk: Results  
21 from a pakistani case-control study. *PLoS One* 10:e0141562.  
22 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141562>
- 23 66. Abd-Elsalam EA-E, Ismaeil NA, Abd-alsalam HS (2015) Vitamin D receptor gene  
24 polymorphisms and breast cancer risk among postmenopausal Egyptian women. *Tumour Biol.*  
25 36:6425–6431. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3332-3>
- 26 67. Reimers LL, Crew KD, Bradshaw PT, Santella RM, Steck SE, Sirosh I, et al (2016) Vitamin D-  
27 Related Gene Polymorphisms, Plasma 25-Hydroxyvitamin D, and Breast Cancer Risk. *Cancer*  
28 *Causes Control* 26:187–203. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0497-9>
- 29 68. Zhang K, Song L (2014) Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and breast  
30 cancer risk: A meta-analysis of 39 studies. *PLoS One* 9:e96125.  
31 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096125>
- 32 69. Akilzhanova A, Abilova Z, Sikhayeva N, Shtefanov I, Makishev A, Adyikhanov T, et al (2013)  
33 Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Kazakhstan. *Cent. Asian J.*  
34 *Glob. Heal.* 2. <https://doi.org/10.5195%2Fcajgh.2013.95>
- 35 70. Wang H, Wang W, Yang D, Wang S (2014) TaqI polymorphism of VDR gene contributes to  
36 breast cancer risk. *Tumour Biol.* 35:93–102. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1011-9>
- 37 71. Wang J, He Q, Shao Y-G, Ji M, Bao W (2013) Associations between vitamin D receptor  
38 polymorphisms and breast cancer risk. *Tumour Biol.* 34:3823–3830.  
39 <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0967-9>
- 40 72. Vahednia E, Shandiz FH, Bagherabad MB, Moezzi A, Afzaljavan F, Tajbakhsh A, et al (2019)  
41 The Impact of CASP8 rs10931936 and rs1045485 Polymorphisms as well as the Haplotypes on  
42 Breast Cancer Risk: A Case-Control Study. *Clin. Breast Cancer* 19:e563–e577.  
43 <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2019.02.011>
- 44 73. Zhang Y, Li W, Hong Y, Wu G, He K, Liu D (2017) A systematic analysis of the association  
45 studies between CASP8 D302H polymorphisms and breast cancer risk. *J. Genet.* 96:283–289.  
46 <https://doi.org/10.1007/s12041-017-0774-y>
- 47 74. Park HL, Ziogas A, Chang J, Desai B, Bessonova L, Garner C, et al (2016) Novel polymorphisms  
48 in caspase-8 are associated with breast cancer risk in the California Teachers Study. *BMC Cancer*  
49 16:1–8. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-2036-9>
- 50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
75. Joshi AD, Lindström S, Hüsing A, Bardahl M, Van Der Weele TJ, Campa D, et al (2014) Additive interactions between susceptibility single-nucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies and breast cancer risk factors in the breast and prostate cancer cohort consortium. *Am. J. Epidemiol.* 180:1018–1027. <https://doi.org/10.1093/aje/kwu214>
76. Khan S, Greco D, Michailidou K, Milne RL, Muranen TA, Heikkinen T, et al (2014) MicroRNA related polymorphisms and breast cancer risk. *PLoS One* 9:e109973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109973>
77. Li Z, Wang J, Wang F, Ma Z, Yu Z (2014) CASP8 -652 6N del polymorphism and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Neth. J. Med.* 72:10–16.
78. Li N, Zhou P, Zheng J, Deng J, Wu H, Li W, et al (2014) A polymorphism rs12325489C>T in the LincRNA-ENST00000515084 exon was found to modulate breast cancer risk via GWAS-based association analyses. *PLoS One* 9:e98251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098251>
79. Smolarz B, Bryś M, Forma E, Zadrozny M, Bieńkiewicz J, Romanowicz H (2019) Data on Single Nucleotide Polymorphism of DNA Repair Genes and Breast Cancer Risk from Poland. *Pathol. Oncol. Res.* 25:1311–1317. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0370-8>
80. Shadrina AS, Ermolenko NA, Boyarskikh UA, Sinkina T V, Lazarev AF, Petrova VD, et al (2016) Polymorphisms in DNA repair genes and breast cancer risk in Russian population: a case-control study. *Clin. Exp. Med.* 16:21–28. <https://doi.org/10.1007/s10238-014-0329-y>
81. Moghaddam AS, Nazarzadeh M, Moghaddam HS, Bidel Z, Karamatnia A, Darvish H, et al (2016) XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis study. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 17:323–335. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.s3.323>
82. Macías-Gómez NM, Peralta-Leal V, Meza-Espinoza JP, Gutiérrez-Angulo M, Durán-González J, Ramírez-González JM, et al (2015) Polymorphisms of the XRCC1 gene and breast cancer risk in the Mexican population. *Fam. Cancer* 14:349–354. <https://doi.org/10.1007/s10689-015-9787-y>
83. Luo H, Li Z, Qing Y, Zhang SH, Peng Y, Li Q, et al (2014) Single nucleotide polymorphisms of DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) associated with breast cancer risk in a Chinese population. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 15:1133–1140. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.3.1133>
84. Popanda O, Seibold P, Nikolov I, Oakes CC, Burwinkel B, Hausmann S, et al (2013) Germline variants of base excision repair genes and breast cancer: A polymorphism in DNA polymerase gamma modifies gene expression and breast cancer risk. *Int. J. Cancer* 132:55–62. <https://doi.org/10.1002/ijc.27665>
85. Wei Y, Wang X, Zhang Z, Xie M, Li Y, Cao H, et al (2019) Role of Polymorphisms of FAM13A, PHLDB1, and CYP24A1 in Breast Cancer Risk. *Curr. Mol. Med.* 19:579–588. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190619125109>
86. He B, Xu Y, Pan Y, Li R, Gao T, Song G, et al (2013) Differential effects of insulin-like growth factor-1 CA repeat polymorphism on breast cancer risk along with race: a meta-analysis. *Gene* 525:92–98. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.041>
87. Shi J, Aronson KJ, Grundy A, Kobayashi LC, Burstyn I, Schuetz JM, et al (2016) Polymorphisms of insulin-like growth factor 1 pathway genes and breast cancer risk. *Front. Oncol.* 6:1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00136>
88. Blanke KL, Sacco JC, Millikan RC, Olshan AF, Luo J, Trepanier LA (2014) Polymorphisms in the carcinogen detoxification genes CYB5A and CYB5R3 and breast cancer risk in African American women. *Cancer Causes Control* 25:1513–1521. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0454-7>
89. He B-S, Pan Y-Q, Lin K, Ying H-Q, Wang F, Deng Q-W, et al (2015) Evaluation the susceptibility of five polymorphisms in microRNA-binding sites to female breast cancer risk in Chinese population. *Gene* 573:160–165. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.052>

## STATEMENTS &amp; DECLARATIONS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Funding

The authors declare that a doctoral scholarship was the only financial support received during the preparation of this manuscript.

## Competing Interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

## Author Contributions

All authors contributed to the conception and design of the study. The PUBMED search, reading of titles, abstracts and full texts and data capture were carried out by Katherine de Souza Rodrigues and supervised by Diêgo Madureira de Oliveira. The first draft of the manuscript was written by Katherine de Souza Rodrigues and Diêgo Madureira de Oliveira and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Supplementary Material

