

VALDIR SHIGUEIRO SIROMA

**POLIMORFISMOS NOS GENES GSTM1 E PROGINS EM MULHERES
DE COMUNIDADES QUILOMBOLAS, MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

MATO GROSSO DO SUL

2011

VALDIR SHIGUEIRO SIROMA

**POLIMORFISMOS NOS GENES GSTM1 E PROGINS EM MULHERES
DE COMUNIDADES QUILOMBOLAS, MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Saúde e Desenvolvimento na
Região Centro-Oeste, da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

Co-orientador: Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim
Guerreiro da Silva

MATO GROSSO DO SUL

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

**Programa de Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste/UFMS**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

MATO GROSSO DO SUL

2011

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE DA BANCA

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

TITULARES

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

Prof. Dr. Guido Marks

Profª Drª Marilene Rodrigues Chang

Prof. Dr. Adalberto Abrão Siufi

SUPLENTE

Prof. Drª Elenir Rose Jardim Cury Pontes

Dedicatória

Ao Prof. Dr. Claudio Kemp
(in memorian), ex-Chefe da Disciplina de Mastologia do
Departamento de Ginecologia da EPM-UNIFESP,
pelas sugestões e confiança na realização do trabalho.

Dedicatória

***Aos meus filhos
Rodrigo, Thais, Valdir e Rodolfo, pelo apoio e compreensão
em todas as etapas do trabalho, mostrando que vale a pena lutar
pelos nossos ideais e sonhos.***

***Ao meu pai Koei Shiroma (in memorian) e à minha querida mãe
Hatsue Shiroma, que com os exemplos e ensinamentos de vida,
mostraram aos filhos, o valor da integridade do caráter.***

Dedicatória

***À minha esposa e companheira Priscila,
pelas palavras de incentivo e carinho
durante todo o desenvolvimento do trabalho.
Seu amor me faz mais forte a cada dia.***

Agradecimentos

Ao Prof Dr. Ricardo Dutra Aydos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pelo apoio, confiança, oportunidade concedida e orientação competente.

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, pelas sugestões e colaboração nos estudos de genotipagens realizados.

À Prof^a Dr^a Elenir Rose Jardim Cury Pontes, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela colaboração nas análises estatísticas dos resultados, e pelo apoio e amizade.

À Prof^a Dr^a Marilene Rodrigues Chang, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo auxílio e apoio durante a coleta de materiais na comunidade.

À Prof^a Dr^a Priscila Aiko Hiane, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela dedicação, afeto e companheirismo, desde a pesquisa no campo até a elaboração final do trabalho.

À Vanessa Espírito Santo Gomes, Enfermeira do Centro de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Jaraguari-MS, pela importante colaboração técnica nos trabalhos desenvolvidos, além do acompanhamento e organização durante a coleta de materiais nas comunidades estudadas.

À Cristhiane Barroso de Souza Nantes, Enfermeira, e à Michelli Cordeiro de Queiroz, Farmacêutica-Bioquímica, do Centro de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Jaraguari-MS, pelo apoio e auxílio durante a coleta de materiais da comunidade de mulheres negras.

Ao João Paulo Klein e Paulo D'Amora, Pós-Graduandos do Laboratório de Ginecologia Molecular, do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), pela realização de análises de genotipagens das amostras e colaboração técnica na discussão e redação do trabalho.

À Vera Nascimento Silva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, pelo apoio técnico-administrativo concedido.

À Neide Trindade Mendes, funcionária da Fundação de Centro de Estudos da Associação Beneficente da Santa Casa-Campo Grande, pela colaboração nos levantamentos bibliográficos.

À equipe da Secretaria de Saúde do Município de Corguinho-MS, que não mediu esforços para a realização da pesquisa na comunidade, dando apoio logístico quanto ao transporte e alimentação.

Ao Antônio Lopes Santana, Coordenador Municipal de Políticas para Promoção da Igualdade Racial do Município de Corguinho-MS, pelo apoio na realização de exames e questionários nas comunidades.

À Alessandra de Santana dos Santos, Agente Comunitária de Saúde da Comunidade Quilombola Furnas do Dionísio e ao Onildo Barbosa, motorista da Secretaria Municipal de Saúde de Jaraguari, pelo auxílio nos trabalhos de transporte e coleta junto às comunidades quilombolas.

Às mulheres quilombolas, as quais gentilmente participaram desse trabalho como população de estudo; e aos representantes locais e/ou das lideranças, nas Comunidades Furnas do Dionísio, Furnas Boa Sorte e São Benedito.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução desta pesquisa.

A minha imensa gratidão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	O Receptor de Progesterona e o Polimorfismo PROGINS	12
Figura 2 –	Localização do gene GSTM1	15
Figura 3 –	Biossíntese do estradiol a partir do colesterol	18
Figura 4 –	Metabolização dos Estrogênios	21
Figura 5 –	Foto do Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando polimorfismo do receptor de progesterona (PROGINS). M: marcador de peso molecular de 100pb. Linhas 2, 4 e 6: presença de heterozigose (P1/P2). Linhas 1, 3 e 5: presença de homozigose (P1/P1). Linha 7: controle negativo	40
Figura 6 –	Foto do Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando polimorfismo do gene da GSTM1. M: marcador de peso molecular de 100pb. Linhas 1 e 5: ausência do gene GSTM1. Linhas 2, 3 e 4: presença do gene GSTM1 e β -globina	42
Figura 7 –	Fotos do Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando polimorfismos do gene da GSTM1 em mulheres de comunidades quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. M: marcador de peso molecular de 100pb	91
Figura 8 –	Fotos do Gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando polimorfismos do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres de comunidades quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. M: marcador de peso molecular de 100pb	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação de exame de mamografia pelo sistema BIRADS	29
Tabela 2 –	Categorias da densidade da mama	30
Tabela 3 –	Componentes para a reação de PCR do polimorfismo PROGINS	38
Tabela 4 –	Iniciadores ou <i>Primers</i> para PCR Master Mix® do polimorfismo PROGINS	39
Tabela 5 –	Componentes para a reação de PCR do polimorfismo GSTM1	41
Tabela 6 –	Iniciadores ou <i>Primers</i> para PCR do polimorfismo GSTM1 (e β -Globina: controle interno)	41
Tabela 7 –	Número e porcentagem de mulheres segundo os tipos de genótipo do polimorfismo GSTM1, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010	45
Tabela 8 –	Número e porcentagem de mulheres segundo os tipos de genótipo do polimorfismo PROGINS, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010	46
Tabela 9 –	Número e porcentagem de mulheres segundo a presença ou não de polimorfismo e as variáveis de estudo, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010 (n=101)	47
Tabela 10 –	Distribuição de mulheres com mais de 35 anos de idade segundo o polimorfismo GSTM1 e PROGINS e os grupos de densidade mamográfica (D1 e D2), Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010 (n=17)	48
Tabela 11 –	Estatística descritiva das variáveis de estudo segundo a densidade mamográfica (D1 e D2) de mulheres com idade acima de 35 anos, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Radiology</i>
BIRADS	<i>Breast Image Reporting and Data System</i>
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CYP17	Citocromo P450c17
CYP1A1	Polimorfismo do citocromo P450c 1A1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ER	Estrógeno
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GST	Glutathione S-transferase
GSTM1	Glutathione S-transferase M1
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRT	Terapias de reposição hormonal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
n	Número
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PROGINS	Receptor de progesterona
rpm	Rotações por minuto
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SULT	Sulfotransferases
TE	Tampão de EDTA
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
%	Porcentagem
°C	Graus centígrados
X ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos	iv
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
Resumo	xi
	1
1. INTRODUÇÃO	
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Populações Quilombolas	6
2.2 Comunidades Quilombolas no Estado de Mato Grosso do Sul	7
2.3 Polimorfismos gênicos	9
2.4 Polimorfismos nas vias de ação dos esteróides sexuais	10
2.4.1 Polimorfismo do Receptor de Progesterona (PROGINS)	10
2.5 Polimorfismos nas vias de metabolização dos esteróides sexuais	13
2.5.1 Polimorfismo da Glutathione-S-transferase (GST)	13
2.6 Biossíntese e ação dos estrogênios	16
2.7 Metabolização dos Estrogênios	18
2.8 Câncer de mama	22
2.8.1 Epidemiologia e fatores de risco	22
2.8.2 Rastreamento do câncer de mama	27
3. OBJETIVOS	31
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODO	33
4.1 Casuística	34
4.2 Métodos	36
4.2.1 Coleta e Processamento do Material Biológico	36
4.2.2 Extração do DNA	37
4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
4.2.4 O Polimorfismo PROGINS	38

4.2.5 O Polimorfismo da GSTM1	40
4.2.6 Avaliação Mamográfica	42
4.3 Análise Estatística	43
5. RESULTADOS	44
5.1 Casuística	45
5.2 Polimorfismo GSTM1	45
5.3 Polimorfismo PROGINs	46
5.4 Variáveis de estudo – características epidemiológicas	46
5.5 Avaliação Mamográfica	47
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS	64
9. ANEXOS	75
Abstract	93
Bibliografia Consultada	95

Objetivos: Estimar a prevalência dos polimorfismos gênicos presentes nos genes do receptor da progesterona (PROGINS) e Glutathione S-transferase (GSTM1), em mulheres afro-descendentes de comunidades Quilombolas do Estado do Mato Grosso do Sul e verificar alguns fatores associados. **Métodos:** Foram analisadas 101 mulheres afro-descendentes das Comunidades Quilombolas de Furnas da Boa Sorte, de Furnas do Dionísio e de São Benedito, incluídas no Programa de Atenção à Saúde das Populações Negras e Indígenas – PASNI-MS (Mato Grosso do Sul). O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico e a genotipagem para os polimorfismos citados foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose. Para a classificação da mamografia e da categoria da densidade da mama foram tomados como base os padrões do sistema ACR-BIRADS, 1998. **Resultados:** Com relação ao polimorfismo PROGINS foram encontradas as seguintes frequências genotípicas: P1/P1 (genótipo selvagem), 94%; P1/P2 (heterozigoto), 6%; e P2/P2 (homozigoto recessivo), 0%. A frequência dos genótipos do polimorfismo GSTM1 na população estudada foi: genótipo positivo (1/1), 98% e genótipo nulo (0/0), 2%. Não se observou relação entre as deleções estudadas e o índice de massa corpórea (IMC), idade da menarca, número de gestações e história de câncer na família. Não houve associação positiva ($p>0,05$) entre os achados mamográficos e classificação BIRADS e as variáveis epidemiológicas analisadas, com exceção da idade que apresentou maior média ($p\leq 0,05$) para as mulheres com padrão mamográfico D2. **Conclusões:** Polimorfismos presentes nesta população em genes envolvidos na ação e metabolização de esteróides sexuais, como PROGINS e GSTM1 são pouco frequentes e parecem não exercer influência no surgimento de condições patológicas como o câncer de mama e nem estão associados com os dados epidemiológicos analisados.

1. INTRODUÇÃO

O DNA genômico possui um grande número de variações na composição de nucleotídeos entre os indivíduos. Essas variações são decorrentes de processos de substituição de nucleotídeos, inserções e/ou deleções de bases, que ocorreram ao longo do processo evolutivo humano, podendo ser transmitidos de geração em geração (Majewski, Ott, 2002).

As substituições, inserções ou deleções que são transmitidas ao longo das gerações e que alcançam níveis iguais ou superiores a 1% na população, são denominadas de polimorfismos (Kwok, Gu, 1999).

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) são comuns em todas as regiões do genoma humano; acredita-se que ocorra um SNP a cada 1.000 bases (Syvänen, 2005). O entendimento da influência de certos polimorfismos no fenótipo dos indivíduos vem sendo objeto de pesquisa de longa data.

Visto que mutações específicas em alguns genes podem aumentar a incidência de alguns tipos de câncer (Pharoah et al, 2004), a ocorrência de polimorfismos no genoma pode afetar a expressão gênica e, por conseguinte, ter relevância também na oncogênese (Zhu, Xia, 2004).

O câncer de mama é uma neoplasia com alta taxa de incidência e mortalidade no Brasil, sendo a segunda neoplasia maligna mais frequente no mundo e a primeira entre as mulheres (Brasil, 2005 e 2009). De acordo com as estimativas de 2010, e válidas também para o ano de 2011, para o câncer de mama no Brasil, o número de casos novos para esse tipo de câncer foi de 49.240, com um risco estimado de 49,27 casos a cada 100 mil mulheres (Brasil, 2009). A prevenção

primária de câncer de mama ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia.

Muitos estudos de base populacional têm mostrado que entre raças de mulheres existem diferenças nos padrões de cuidados para com o câncer de mama, havendo acesso desigual quanto ao estado de arte no tratamento dessa doença. Dados têm sido publicados, mostrando que a incidência de câncer de mama é maior entre as mulheres caucasianas do que entre as afro-americanas, nos Estados Unidos (Du & Simon, 2005; Simon et al, 2005; Tammemagi et al, 2005).

Sabe-se que a herança genética, agindo por meio de polimorfismos, apresenta papel relevante na gênese de câncer de mama e que os polimorfismos podem contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, sobretudo aquelas em tecidos dependentes de hormônio, e também explicar as variações individuais na densidade mamográfica (Haiman et al, 2003).

A avaliação da população quanto aos fatores de risco para câncer de mama e a influência de polimorfismos relacionados à doença constitui atualmente ferramentas importantes no estudo da susceptibilidade individual ao câncer de mama.

O conhecimento mais aprofundado das variações genéticas pode ser o caminho para ações mais eficazes no sentido de se estabelecer procedimentos ou orientações que levam à prevenção primária de câncer de mama e seu controle adequado quando a doença já se estabeleceu, principalmente individualizando a indicação terapêutica mais agressiva (Morais, 2008).

Assim, no presente trabalho foi proposto estimar a prevalência dos polimorfismos PROGINS (presente no gene do receptor de progesterona) e Glutathione-S-Transferase M1 (GSTM1) em mulheres afro descendentes de três comunidades Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul, e verificar fatores clínicos e suas possíveis associações com os genes polimórficos e a densidade mamográfica, visando obter dados da etnia negra que possam gerar uma forma efetiva de contribuir para a prevenção, especialmente contra o câncer.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Populações Quilombolas

Na primeira metade do século XVI, representado principalmente por portugueses e espanhóis, trazidos pelos colonizadores portugueses, os africanos são introduzidos no Brasil para o trabalho escravo. Em 1538, os primeiros escravos negros chegam ao Brasil (Salles, 1973). Porém, somente na segunda metade do século XVIII, o escravo africano entra em outras regiões do Brasil de forma compulsória. O número estimado foi de 53.000 entre os anos de 1755 e 1820 (Salles, 2005).

Segundo Vergolino-Henry & Figueiredo (1990), os negros introduzidos no Brasil são nativos das seguintes regiões: Guiné Portuguesa, atualmente Guiné Bissau e Cachéu; ilhas de Cabo Verde, correspondente a república do Cabo Verde; Reinos de Angola, Luanda e Benguela, os quais compõe hoje a República Popular de Angola; Costa Oriental da África, equivalente à República do Quênia; Norte e Sul do Rio Rovuna, atuais República da Tanzânia e República Popular de Moçambique; Reino de Mazagão e Guiana Francesa, atualmente correspondente a República Dominicana.

Muitos africanos, durante o período escravocrata, fugiram de grandes fazendas para a floresta, devido aos maus tratos e humilhações aos quais eram constantemente submetidos (Schwarcz, 1993; Salles, 2005).

Como resultado destas fugas, comunidades rurais afro-brasileiras, denominadas de Quilombos, foram formadas durante os séculos XIX e XX. Muitos destes quilombos permaneceram, em parte, isolados na floresta preservando suas identidades sociais, culturais e genéticas (Schwarcz, 1993).

Observa-se então, que durante os últimos três séculos de ocupação da região sudoeste, três etnias, o africano, o ameríndio e o europeu, diferentes do ponto de vista biológico e cultural, interagiram entre si em resposta as demandas ambientais e sociais. Destas interações, as comunidades afro-brasileiras do passado deram origem atualmente a populações quilombolas (Schwarcz, 1993; Silva, 2004; Telles, 2003).

2.2 Comunidades Quilombolas no Estado de Mato Grosso do Sul

No Estado de Mato Grosso do Sul (MS), as Comunidades Remanescentes de Quilombolas são formadas por pequenos agricultores rurais negros, inseridos em grupos que participam de programas como o de agricultura familiar. Suas origens estão nas fugas com ocupação, nas heranças, doações, recebimentos de terras como pagamento de serviços prestados ao Estado, simples permanência nas terras que ocupavam e cultivavam no interior de grandes propriedades, bem como a compra de terras, tanto durante a vigência do sistema escravocrata quanto após sua abolição. Informações conduzem a que os antepassados das Comunidades negras do Estado teriam vindo para a região logo ao fim do período escravista, das cidades de Minas Gerais e Goiás (Sundfeld, 2002).

Furnas dos Dionísio foi fundada em 1901, e leva esse nome porque o seu primeiro morador teria sido um senhor conhecido pelo nome de Dionísio Antônio Vieira, ex-escravo oriundo de Minas Gerais. A comunidade é localizada a 48 km de Campo Grande, no município de Jaraguari (MS). Atualmente, as noventa e duas famílias da comunidade quilombola Furnas do Dionísio, habitam a área em

situação regularizada, pois, em 2009, o Incra reconheceu e declarou como território da Comunidade Remanescente de Quilombo Furnas do Dionísio, a área de 1.018,2796 hectares (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária, 2009).

Furnas da Boa Sorte é uma comunidade rural composta de 220 pessoas entre 68 famílias remanescentes do quilombo, situada no Município de Corguinho, região central do Estado de Mato Grosso do Sul. Conforme reportado no Relatório Antropológico da Fundação Palmares, no projeto de titulação da gleba, a comunidade tornou-se local de isolamento devido à posição geográfica privilegiada tanto pela conformação sinuosa do terreno que forma a Serra de Maracaju como pelo fato de encontrar-se no chamado caminho as águas da rota de Vacaria e da Fazenda Taboco (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária, 2009; Andrade Filho, 2007).

A comunidade de São Benedito está localizada no centro-urbano de Campo Grande, com uma população de 1000 pessoas, e teve como a sua primeira moradora a matriarca Eva Maria de Jesus. Sobre o que contam os seus descendentes, Eva era benzedeira e possuía uma inabalável fé católica. Construiu, em torno de 1910, uma pequena igreja de madeira, hoje reconstruída em alvenaria e conhecida na cidade como “A Igrejinha” (Silva, 2003; Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária, 2009).

As consequências genéticas de todo um processo de formação e expansão destas populações tem sido alvo de intensas investigações através de vários níveis biológicos (polimorfismos clássicos, mtDNA e nuclear). Para contribuir com estas investigações pretende-se avaliar a real contribuição de polimorfismos africanos em uma comunidade quilombola, assim como investigar a presença ou

não de condições patológicas associadas à ação e metabolização de hormônios sexuais.

2.3 Polimorfismos gênicos

O DNA genômico possui um grande número de variações na composição de nucleotídeos entre os indivíduos. Essas variações são decorrentes de processos de substituição de nucleotídeos, inserções e/ou deleções de bases, que ocorreram ao longo do processo evolutivo humano, podendo ser transmitidos de geração em geração (Majewski, Ott, 2002).

Quando as substituições ocorrem em regiões codificantes, podem acarretar mudanças na sequência de aminoácidos da proteína (substituição não-sinônima). Consequentemente, as substituições não-sinônimas podem causar alterações funcionais e estruturais significativas nas proteínas. Em contrapartida, substituições que não alteram a sequência protéica são denominadas de substituições sinônimas. Essas substituições em regiões não-codificantes, como promotores e íntrons, podem alterar a estrutura e a estabilidade do RNAm (Majewski, Ott, 2002), diminuindo ou aumentando a transcrição gênica (Majewski e Ott, 2002; Pharoah et al, 2004).

As substituições, inserções ou deleções que são transmitidas ao longo das gerações e que alcançam níveis iguais ou superiores a 1% na população, são denominadas de polimorfismos (Kwok, Gu, 1999).

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) são comuns em todas as regiões do genoma humano;

acredita-se que ocorra um SNP a cada 1.000 bases (Syvänen, 2005). O entendimento da influência de certos polimorfismos no fenótipo dos indivíduos vem sendo objeto de pesquisa de longa data.

Visto que mutações específicas em alguns genes podem aumentar a incidência de alguns tipos de câncer (Pharoah et al, 2004), a ocorrência de polimorfismos no genoma pode afetar a expressão gênica e, por conseguinte, ter relevância também na oncogênese (Zhu, Xia, 2004).

2.4 Polimorfismos nas vias de ação dos esteróides sexuais

2.4.1 Polimorfismo do Receptor de Progesterona (PROGINS)

O gene do receptor de progesterona humano (PRh) pertence a superfamília dos receptores esteroídicos e está localizado no cromossomo 11q22-23 (Figura 1A) (Rowe et al, 1995), e é responsável por mediar as ações da progesterona (Carvalho et al, 2007), sendo assim, um importante regulador no crescimento e diferenciação da glândula mamária e do sistema reprodutor feminino além de estar envolvido no desenvolvimento de tumores malignos (Fajani et al, 2002).

O gene PRh utiliza promotores e sítios de iniciação da tradução diferentes para produzir duas isoformas denominadas hPR-A e hPR-B (Modugno, 2004). A isoforma A consiste de 764 aminoácidos e peso molecular de 94 kDa, enquanto a isoforma B apresenta uma adição de 164 aminoácidos em sua região N-terminal, resultando em uma proteína de 114 kDa (Li, O'Malley, 2003). Ambas as isoformas possuem três domínios funcionais conservados: a região N-terminal, o

domínio de ligação do DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD) (Kastner et al, 1990).

Outras variantes do receptor de progesterona (Figura 1B), além do hPR-A e hPR-B foram relatadas posteriormente, tais como o hPR-C, hPR-S e o hPR-T (Hirata et al, 2002).

Vários polimorfismos têm sido identificados no gene do receptor de progesterona humano e, dentre eles, destaca-se o polimorfismo PROGENS que consiste de uma inserção *Alu* de 306 pb no íntron G (Figura 1B), entre o éxon 7 e 8; uma mutação pontual silenciosa no éxon 5 (rs1042839) (C→T) e uma substituição de um único aminoácido no éxon 4 (rs1042838) (G→T / Valina → Leucina), identificado por Rowe et al em estudo com o câncer de ovário (Rowe et al, 1995; Kieback et al, 1998; Wang-Gohrke et al, 2000; Hsieh et al, 2003), também conhecido como complexo PROGENS (Fajani et al, 2002; Kieback et al, 1998).

Segundo McKenna et al (1995), esse polimorfismo resulta em uma transcrição anômala do gene do receptor de progesterona por recombinação ou por um erro no processamento do transcrito primário, levando a uma perda da capacidade de ligação do hormônio ao receptor e da sua ativação, com consequente queda da atividade da progesterona.

Evidências sugerem que ambas isoformas exerçam atividades funcionalmente distintas, hPR-A tem mostrado ação repressora do gene do receptor de estrogênio enquanto hPR-B tem grande capacidade de ativá-lo (Fajani et al, 2002; Modugno, 2004).

Fajani et al (2002) verificaram que a isoforma hPR-A parece ser a proteína envolvida com o polimorfismo PROGENS, o qual parece conferir

decréscimo em sua estabilidade com perda da capacidade de inibir a ativação dos receptores estrogênicos. Kieback et al (1998) acreditam que a isoforma hPRA, sob a ação do polimorfismo PROGENS, condicionaria também uma disfunção na atuação da isoforma hPRB.

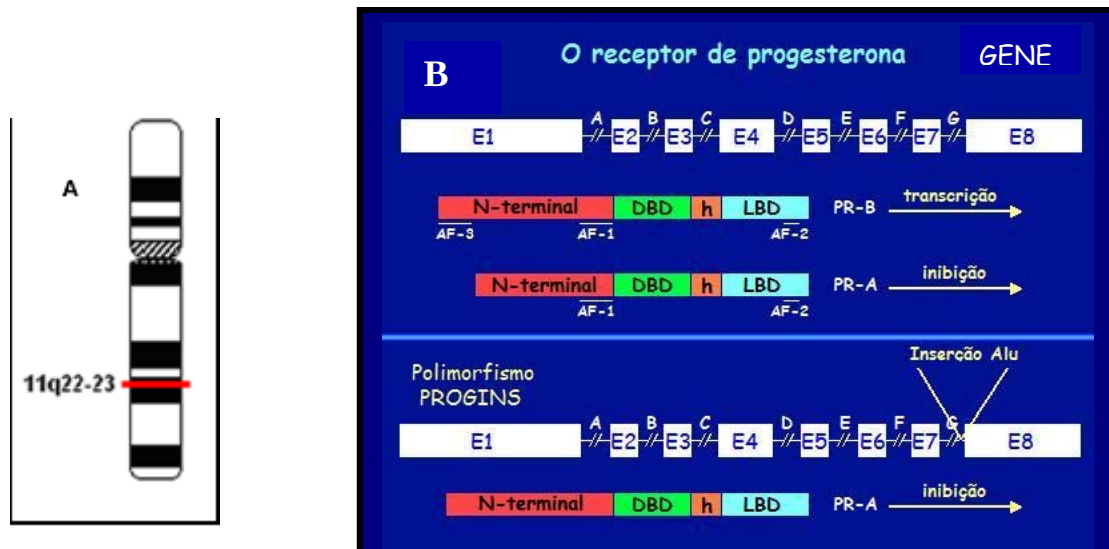


Figura 1: O Receptor de Progesterona e o polimorfismo PROGENS. Na Figura 1A, destaca-se em vermelho a localização do gene do receptor de progesterona no cromossomo 11, obtido de NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=607311>) Na figura 1B pode-se observar a estrutura e domínios funcionais dos diferentes tipos de receptor de progesterona, bem como a inserção Alu que caracteriza o polimorfismo PROGENS. Modificado de Margolis et al (2005).

O polimorfismo PROGENS tem sido estudado em associação com o câncer de mama, endométrio, ovário, bem como a endometriose e abortos de repetição (McKenna et al, 1995; Wang-Gohrke et al, 2000; Kurz et al, 2001; Pearce et al, 2005; Romano et al, 2006; Carvalho et al, 2007; Junqueira et al, 2007). Com relação ao câncer de ovário, o primeiro estudo realizado foi em 1995, por McKenna e colaboradores e sugere um possível aumento no risco da doença associada ao polimorfismo em uma população germânica e irlandesa. Recentes estudos também continuaram encontrando associação positiva entre o polimorfismo PROGENS e o

câncer de ovário (Runnebaum et al, 2001; Agoulinik et al, 2004; Pearce et al, 2005; Romano et al, 2006, Leite et al, 2008).

Entretanto, outros estudos falharam ao tentar estabelecer alguma diferença estatística significativa associada ao risco da doença (Manolitsas et al, 1997; Lancaster et al, 1998; Spurdle et al, 2001; Tong et al, 2001; Lancaster et al, 2003).

2.5 Polimorfismos nas vias de metabolização dos esteróides sexuais

2.5.1 Polimorfismo da Glutathione-S-transferase (GST)

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado pelos resíduos de glicina, glutamato e cisteína e está presente na maioria das células de espécies aeróbias. Seu papel em processos de detoxificação, em associação com diferentes enzimas, é fundamental para conferir resistência à célula (Rossini et al, 2002).

A função deste tripeptídeo é fundamental para a biologia da célula, visto que modula a resposta celular por oxido-redução, detoxifica drogas e metabólitos, regula a expressão gênica e a apoptose e também está envolvida no transporte de solutos orgânicos através de membranas (Jefferies et al, 2003).

A glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas intracelulares que impedem a ação de toxinas endógenas e exógenas sobre as células, evitando assim danos ao DNA celular e constituindo uma família de enzimas responsáveis pelo metabolismo de uma série de xenobióticos e carcinógenos, que catalisam a conjugação da glutathione, tornando-os solúveis e

possíveis de serem excretados em água (Mannervik et al, 1992; Strange, Fryer, 1999; Hayes et al, 2005).

Dessa forma, as GSTs desempenham papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com as glutathionas, como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros, impedindo a ligação destes ao DNA (Strange, Fryer, 1999).

Esses compostos eletrofílicos reativos podem ser resultantes ainda, de processos endógenos, iniciados, por exemplo, na respiração e em processos inflamatórios, ou ainda, por radiação ionizante com a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais superóxido e hidroxila (Lang, Pelkonen, 1999). Assim, é possível concluir que tais enzimas desempenham uma função protetora contra a atuação dos radicais livres (Taningher et al, 1999).

Dessa forma, inúmeras evidências sugerem que a modulação de enzimas da fase II, como a glutathione S-transferase, desempenha um importante papel no processo carcinogênico e na proteção contra carcinógenos (Kwak et al, 2001).

Os genes da GST apresentam polimorfismos genéticos que podem alterar a atividade da enzima, contribuindo para a diferença inter-individual nas respostas aos xenobióticos (Hayes et al, 2005; Zhong et al, 2006).

As GSTs citosólicas humanas são classificadas de acordo com a diferença na sequência dos aminoácidos. E são divididas em sete classes distintas: α (A), μ (M), π (P), σ (Sigma), ξ (Zeta), ω (Omega) e θ (T) (Hayes et al, 2005).

Cinco genes μ (M) foram identificados: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4, GSTM5 (Hayes et al, 2005). O gene do GSTM1 está localizado no cromossomo 1p13.3 (Figura 2), contém 8 éxons e gera uma proteína de 217 aminoácidos com um peso molecular de 25.6 kDa (Hayes et al, 2005).

É interessante ressaltar que um grande número de indivíduos não expressa a enzima devido a uma deleção homozigótica do gene. Uma explicação para isso seria a possível ocorrência de um *crossing-over* desigual (Mitrinen, Hirvonen, 2003). Diante disso, indivíduos que possuem a deleção homozigótica para o GSTM1 podem apresentar um aumento do risco para o desenvolvimento de várias doenças neoplásicas, como o câncer.

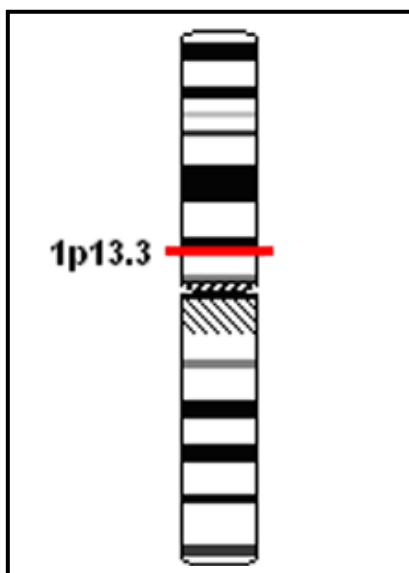


Figura 2 - Localização do gene GSTM1. Destaca-se em vermelho a localização do GSTM1 no cromossomo1, obtido de NCBI—
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=138350>

Alguns trabalhos têm avaliado o papel do polimorfismo GSTM1 e a relação com o desenvolvimento do câncer de ovário e carcinoma colorretal, apresentando resultados conflitantes (Sarhanis et al, 1996; Hengstler et al, 1998; Lallas et al, 2000; Baxter et al, 2001; Spurdle et al, 2001; Coughlin, Hall, 2002; Beeghly et al, 2006; Ansolin et al, 2010).

O gene GSTM1, que é polimórfico na população, ocorre em cerca de 30-50% dos indivíduos, dependendo do grupo étnico a que pertencem. No trabalho de Losi-Guembarovski & Cólus (2001), estudando a distribuição étnica e relação com câncer associadas aos alelos específicos dos genes glutathione S-transferase M1 (GSTM1), no Brasil, observaram que os diferentes estudos desenvolvidos, em diversos países, com genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos, são de grande importância para o estabelecimento definitivo das frequências destes genes nas diferentes populações humanas, e podem ser utilizados como biomarcadores no auxílio à prevenção e tratamento do câncer.

2.6 Biossíntese e ação dos estrogênios

O estrogênio é o hormônio básico da mulher e sua produção começa na adolescência, quando é responsável pelo aparecimento dos sinais sexuais secundários, e vai até a menopausa. No menacme, a principal fonte de produção é o ovário, sendo que as supra-renais também podem sintetizá-lo, porém essa função parece ser mais definida após a menopausa (Lima et al, 2003).

A síntese de todos os esteróides tem como precursor o colesterol e os três estrogênios sintetizados pelo ovário são a estrona, o estradiol e o estriol,

sendo que o estradiol é o hormônio de maior relevância no menacme e a estrona, no climatério (Kushner et al, 2000).

A forma de ação mais importante do estrogênio é a ligação com o seu receptor. Estrogênios se difundem pelo interior das células e se ligam ao estrógeno (ER), localizado no núcleo. Dessa forma, o complexo formado se liga a elementos de resposta ao estrógeno direta ou indiretamente por meio de interações proteína-proteína com o ativador de proteína (AP1) ou sítios SP1 na região promotora dos genes de resposta ao estrógeno, o que resulta no recrutamento de proteínas co-reguladoras (co-ativadoras ou co-repressoras) a fim de promover, aumentar ou decair os níveis de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) e a produção de proteínas associadas (Jakimiuk et al, 2007).

Na figura 3, observa-se a via de síntese dos esteróides ovarianos a partir do colesterol, formando-se androgênios (androstenediona e testosterona) e finalmente os estrogênios. Na primeira fase do ciclo parece predominar a via delta-5 (a partir da 17-hidroxipregnenolona), vista à esquerda da figura. Na segunda fase parece haver predominância da via delta-4 (a partir da progesterona), vista a direita da figura. Por sua vez, estão envolvidas na biossíntese do estradiol, enzimas da superfamília do citocromo P450, como CYP11A1, CYP17 e CYP19 bem como as hidroxisteróides desidrogenases 3 β -HSD e 17 β -HSD (Thompson, Ambrosone, 2000).

Portanto, a clivagem da cadeia do colesterol pela ação da enzima CYP11A forma a pregnenolona que, pela ação da enzima 3 β -HSD, é convertida em progesterona (pregnenolona e progesterona são esteróides C21) (Thompson, Ambrosone, 2000).

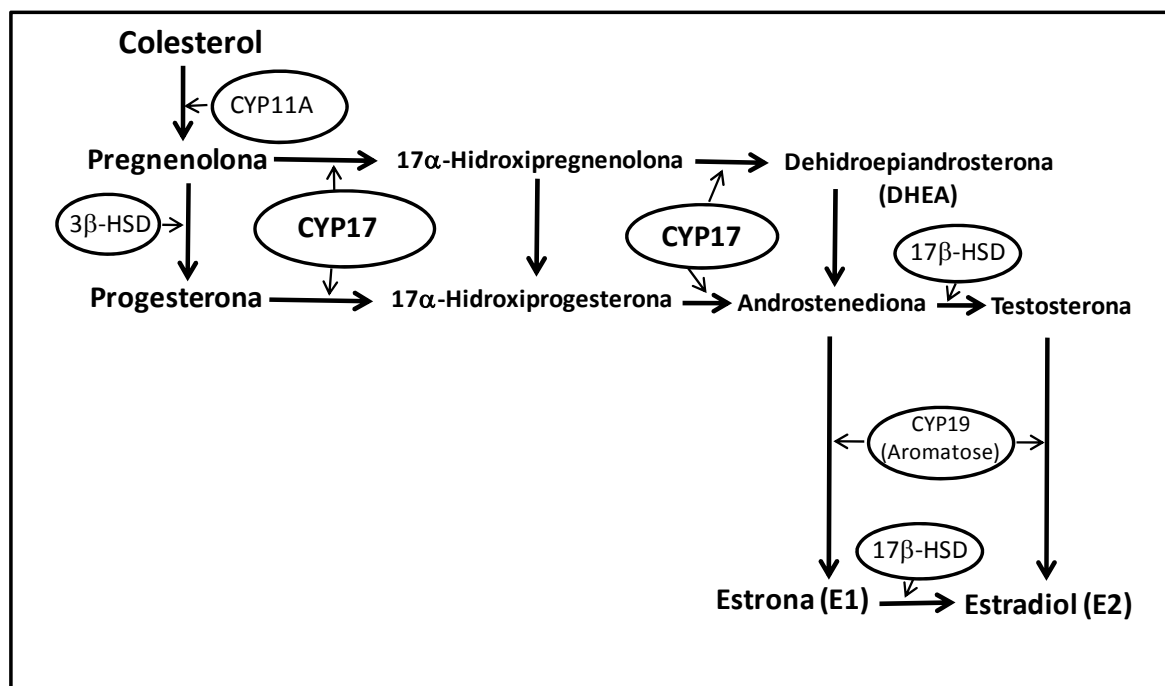


Figura 3 - Biossíntese do estradiol a partir do colesterol. Destaca-se na biossíntese do estradiol a participação das enzimas da superfamília do citocromo P450, como CYP1A1, CYP17 e CYP19 (Thompson, Ambrosone, 2000).

A hidroxilação e a subsequente clivagem do esteróide C21 pela ação da CYP17 produzem os esteróides C19, androstenediona e dehidroepiandrosterona; sendo a androstenediona a precursora para a formação da testosterona através da ação da enzima 17β-HSD (Mitrunen, Hirvonen, 2003).

Assim, a aromatização da androstenediona e testosterona, respectivamente, catalizadas pela ação da CYP19 (aromatase) forma, finalmente, os estrogênios estrona e estradiol (Thompson, Ambrosone, 2000).

2.7 Metabolização dos Estrogênios

Os estrogênios são metabolizados por reações de oxidação e conjugação que podem levá-los à desativação e à sua subsequente eliminação

(Figura 3). Alternativamente, as reações de oxidação e conjugação dos estrogênios podem gerar metabólitos que possuem atividades biológicas distintas, incluindo propriedade de alteração hormonal, genotoxicidade (através da formação de espécies ativas que modificam DNA e proteínas) e/ou propriedades quimioterápicas (através da formação de derivados que são antagônicos ao receptor de estrogênio) (Thompson, Ambrosone, 2000).

A metabolização dos estrogênios envolve dois tipos de enzimas: as de metabolismo mediado pelas oxidases de função mista, ou de Fase I e as enzimas de conjugação, ou de Fase II (Hayes et al, 2005).

As enzimas oxidativas da fase I são principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs) (Raunio et al, 1995). As reações da Fase II envolvem a conjugação com substrato endógeno (glutathione) através das glutathione-S-transferases (GSTs) que agem como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando tais metabólitos mais hidrofílicos e, dessa forma, passíveis de excreção (Raunio et al, 1995; Torresan et al, 2008)).

A metabolização do estradiol e estrona pode ocorrer por duas vias distintas: a hidroxilação do anel A ou do anel D. A hidroxilação do anel A leva à formação de catecolestrogênios (CEs), denominados 2 ou 4-hidroxiestrone e 2 ou 4-hidroxiestradiol, enquanto a hidroxilação do anel D forma a 16 α -hidroxiestrone. Os catecolestrogênios são os principais metabólitos dos estrogênios, os quais são inativados principalmente pela O-metilação, catalizada pela catecol-O-metiltransferase (COMT) (Mitrinen, Hirvonen, 2003).

A metabolização dos catecolestrogênios forma semiquinonas (CE-SQ) e quinonas e, além disso, a ciclagem redox entre CE-SQs e CE-Qs produz

espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos oxidativos aos lipídeos das membranas e também ao DNA (Ácido desoxiribonucléico). Esses ROS têm sido descritos como potenciais iniciadores da formação tumoral (Yager, Liehr, 1996).

A CE-2,3 Q pode-se ligar de forma estável ao DNA, enquanto a forma CE-3,4Q se liga ao DNA em regiões onde predominam bases púricas, as quais são perdidas através da clivagem das suas pontes glicosídicas. Supõe-se que o último evento possa causar iniciação tumoral (Mitrunen, Hirvonen, 2003).

As quinonas podem ser conjugadas com glutathiona (GSH) por meio da ação das GSTs (Glutathione S-transferases) ou reduzidas a catecolestrogênios através da quinona redutase (Cavalieri et al, 1997). As semiquinonas podem reagir com o oxigênio molecular para formar radicais superóxidos, os quais são reduzidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espontaneamente ou então são catalisados por superóxidos desmutases, como o MnSOD (Superóxido Dismutase Dependente de Manganês) (Cavalieri et al, 1997; Liehr, 2000).

O peróxido de hidrogênio é neutro e não reativo, exceto na presença de íons de metais de transição reduzidos (Fe^{2+}), o qual permite a formação do oxidante mais potente, o radical hidroxila (OH). O H_2O_2 também pode atravessar a membrana nuclear e celular, alcançando o DNA das células vizinhas (Cadet et al, 1999).

Diferenças existentes entre os indivíduos nas vias de conjugação dos estrogênios e catecolestrogênios podem definir subpopulações de mulheres com maior exposição a estes elementos ao longo da vida, podendo levar a um aumento das taxas de dano celular (Mitrunen e Hirvonen, 2003).

Atualmente, tem sido evidenciado o estudo de polimorfismos em genes de baixa penetrância, que codificam enzimas envolvidas na ação, biossíntese e no metabolismo de estrogênios e o possível papel deles na suscetibilidade ao câncer de mama e de ovário (Mitrunen e Hirvonen, 2003; Torresan et al, 2008).

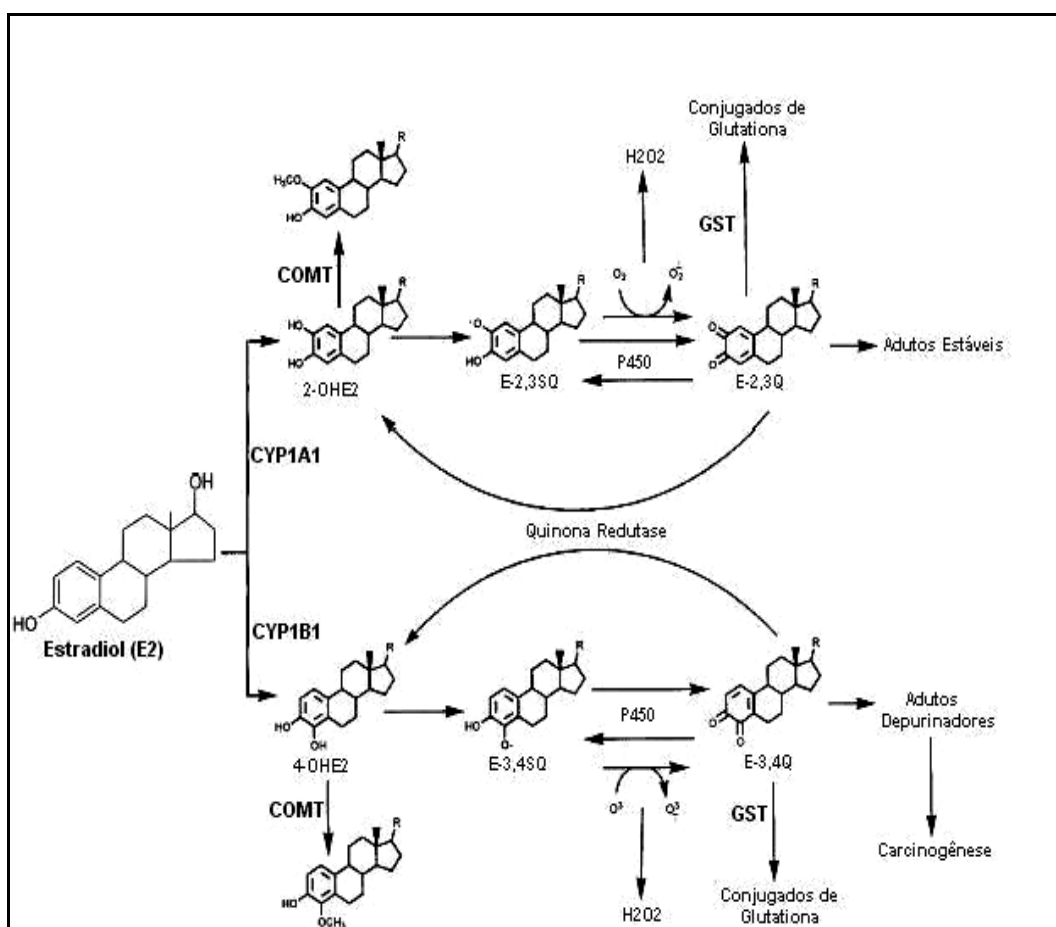


Figura 4: Metabolização dos Estrogênios: destaca-se que metabolização envolve dois tipos de enzimas: as de metabolismo mediado pelas oxidases de função mista, ou de Fase I (citocromo P450 (CYPs) e as enzimas de conjugação, ou de Fase II (GSTs).

2.8 Câncer de mama

2.8.1 Epidemiologia e fatores de risco

O câncer de mama é uma neoplasia com alta taxa de incidência e mortalidade no Brasil. De acordo com as estimativas de 2010, e válidas também para o ano de 2011, para o câncer de mama no Brasil, o número de casos novos para esse tipo de câncer foi de 49.240, com um risco estimado de 49,27 casos a cada 100 mil mulheres, sendo que na região Centro-Oeste, a estimativa foi de 37,68 casos novos/100 mil, para o câncer de mama (Brasil, 2009).

No Estado de Mato Grosso do Sul e no Município de Campo Grande, as estimativas/2006 de número de casos novos por câncer de mama foram de 550, no Estado, e de 260, no Município (Brasil, 2009). O Câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. Mais da metade dos casos novos ocorre em países desenvolvidos. Seu prognóstico é relativamente bom, se diagnosticado nos estádios iniciais. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (Brasil, 2007 e 2009).

A prevenção primária de câncer de mama ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Não existem medidas práticas específicas de prevenção primária dessa neoplasia, aplicável à população, mesmo que estudos observacionais tenham sugerido que a prevenção quanto ao hábito de fumar, alcoolismo, obesidade e sedentarismo diminuam o risco de câncer de mama.

Avanços na tecnologia têm surgido para o diagnóstico precoce e o tratamento no sentido de melhorar a sobrevida das pacientes (Brasil, 2009).

Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005) mostra que 34,4% das mulheres brasileiras com mais de 40 anos de idade nunca foram submetidas a exame clínico das mamas por um profissional de saúde. Nos últimos dois anos, entre as mulheres com 50 anos de idade ou mais, a cobertura do exame mamográfico foi de 41,2%. Nesta faixa etária, 49,7% das entrevistadas afirmaram jamais haver feito este exame.

A articulação de ações dirigidas ao câncer de mama e do colo do útero está fundamentada na Política Nacional de Atenção Oncológica (2005), através da Portaria GM nº 2439 de 08/12/2005. Essa articulação trata das seguintes diretrizes estratégicas, compostas por ações a serem desenvolvidas, nos distintos níveis de atenção à saúde: aumento da cobertura da população-alvo; garantia da qualidade; fortalecimento do sistema de informação; desenvolvimento de capacitações; desenvolvimento de pesquisas e mobilização social.

Muitos estudos de base populacional têm mostrado que entre raças de mulheres existem diferenças nos padrões de cuidados para com o câncer de mama, havendo acesso desigual quanto ao estado de arte no tratamento dessa doença. Dados têm sido publicados, mostrando que a incidência de câncer de mama é maior entre as mulheres caucasianas do que entre as afro-americanas, nos Estados Unidos (Du & Simon, 2005; Simon et al, 2005; Tammemagi et al, 2005). Nesse país, no período de 1998 a 1993, a incidência de câncer de mama nas mulheres de raça branca foi de 90,7 casos por 100 mil mulheres/ano e nas de raça negra foi de 79,3 casos por 100mil/ano. Foi observado também que a

incidência padronizada pela população mundial, ajustada por idade, chega a 127 e 128/1000 mil mulheres em algumas regiões do norte dos Estados Unidos e no Havaí, ao passo que na China e na África, a incidência é de apenas 17 e 21/100 mil, respectivamente (Paulinelli et al, 2003; Ries, Eisner & Kosary, 2001; World Health Organization, 2001).

Ainda, estudos pela observação de prevalência de agravos nas populações, buscando correlação com os hábitos sociais e origens étnicas e familiares de indivíduos, dados de literatura têm apresentado resultados preocupantes sobre a incidência do câncer de colo uterino entre povos indígenas. Young & Choi (1985) apontam prevalência de 14% de neoplasia cervical em 115 casos de câncer ocorridos em habitantes de reservas indígenas de Manitoba, Canadá, de 1970 a 1979. Storn et al, em 1990, demonstraram que, na Groenlândia, a incidência foi de 3,2 vezes maior em mulheres nativas quando comparadas a mulheres dinamarquesas.

Taborda et al, em 2000, no rastreamento do câncer de colo uterino em índias do Parque Indígena do Xingu, Brasil central, encontraram dados que estão de acordo com a literatura internacional quanto à elevada prevalência dessas doenças em populações nativas. Elevados índices de doenças sexualmente transmissíveis, início precoce da atividade sexual e multiplicidade de parceiros sexuais foram apontados como os principais fatores de risco responsáveis pela elevada ocorrência de neoplasia cervical na população.

Em estudo epidemiológico do câncer de mama no estado da Paraíba, foi estimado que 10% das mulheres da população geral dos países ocidentais desenvolverão, em alguma época de sua vida, o câncer de mama. Essa estimativa poderá diminuir em algumas subpopulações, como as das mulheres negras ou

aumentar como as das mulheres judias de origem askenazi (Leal, Santos, Maia, 2002).

Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama. E ainda, as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e depois dessa idade as mesmas se dão de forma mais lenta (Brasil, 2007 e 2009).

Estudos diversos mostram que a urbanização da sociedade e as condições socioeconômicas (sedentarismo, obesidade, crescimento do produto interno bruto) são fatores que devem ser levados em consideração como os de risco para o câncer de mama (Li et al, 2008; Bell, Ge, Popkin, 2002). Thuler (2005) mostrou que a urbanização da sociedade é o fator responsável por cerca de 80% dos casos principalmente por envolver o processo de industrialização e poluição. E Koifman (1999) apontou o aumento da expectativa de vida como um dos principais fatores para o aumento da mortalidade por câncer.

Wasserman et al (2004) associaram a obesidade em mulheres pós menopausa com câncer de mama, com uma variedade de fatores, incluindo predisposição genética, classe social, menarca precoce, exercício físico, consumo de álcool e dieta. No estudo, foram comparados os genótipos (PR e A1B1) de mulheres pós menopausa com câncer de mama, com essas variáveis, em termos da força de sua relação com a obesidade (Índice de Massa Corporal = 30 kg/m²), mostrando que a menarca precoce e o padrão genético avaliados tinham níveis comparáveis de associação com a obesidade na amostragem das mulheres com câncer de mama estudado.

Em um estudo descritivo sobre morbi-mortalidade do câncer na cidade do Recife na década de 90 (Oliveira Júnior, Cesse, 2005), os resultados apontam o câncer de mama como a topografia de maior incidência no sexo feminino, mostrando a necessidade de um olhar epidemiológico atento e qualificado no conhecimento e evolução desse agravo.

Estudos analíticos e de caso-controle têm investigado a relação entre dieta e câncer de mama. Além da dieta, existem estudos também relacionando a doença com estilos de vida e fatores ambientais, como consumo de álcool, hábito de fumar, índice de massa corporal, atividade física e uso de alguns medicamentos. Bosetti, Altieri & Vecchia (2002), reportando avanços nessas relações, mostram que vegetais e frutas parecem ter efeito protetor quanto ao aparecimento de câncer de mama e ginecológico; e que o consumo de álcool possivelmente está relacionado ao risco de câncer de mama e ainda, que a atividade física tem sido associada com a redução de risco de câncer de mama.

Fatores de risco e estratégias de redução de riscos de câncer de mama têm confirmado que história familiar (principalmente parente de primeiro grau – mãe, irmã ou filha), fatores reprodutivos e lactação, assim como a idade da menarca e menopausa levam ao agravo e surgimento da doença. Dados têm mostrado também que terapia de reposição hormonal aumenta o risco enquanto que contraceptivos orais provavelmente não aumentam esse risco; bebida alcoólica consumida moderadamente aumenta o risco e dietas ricas em folatos e carotenóides conferem efeito protetor à doença; o efeito do fumo e atividade física ainda não está bem esclarecido; em portadoras dos genes mutantes BRCA1 e BRCA2, a cirurgia profilática de mama pode reduzir significativamente o risco de

câncer; e a obesidade deve ser alvo de ação de promoção à saúde, inclusive quanto à diminuição do risco ao câncer de mama (Brekelmans, 2003).

A base genética que envolve a síntese de proteínas responsáveis pela manutenção dos níveis hormonais foi recentemente reconhecida como um

importante fator de risco para câncer de mama (Feigelson & Henderson, 2000). Tem-se tornado mais claro que a herança genética, agindo por meio de polimorfismos, apresenta papel relevante nessa gênese. Pode-se definir polimorfismo como uma variação genética que ocorre normalmente na população geral, com frequência > 1% (Nussbaum et al, 2002). Os polimorfismos podem contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, sobretudo aquelas em tecidos dependentes de hormônio, e também explicar as variações individuais na densidade mamográfica (Haiman et al, 2003).

2.8.2 Rastreamento do câncer de mama

Rastreamento de câncer de mama por mamografia é uma medida útil para identificar a doença no estágio inicial quando o tratamento pode ser mais efetivo, com menos risco de diagnosticar tumores grandes, letais e palpáveis (Michaelson et al, 2002). Edwards et al (2009), avaliando as diferenças étnicas no uso regular de mamografia, incluindo mulheres afro-americanas, latinas, havaianas nativas, japonesas e brancas, procedentes do Havaí e de Los Angeles, com idade entre 45 a 75 anos (n=81.722), concluíram que as três primeiras etnias tinham significativamente realizado menos exames mamográficos do que as mulheres

brancas e japonesas; e esse resultado estava associado à idade, educação, história familiar.

As tentativas de encontrar bases genéticas para a densidade mamográfica são recentes. A hipótese de que a transmissão de um gene dominante influenciava a densidade mamográfica resultou na análise de 1.370 mamografias em 258 famílias independentes, observando-se uma associação significativa entre irmãs. Acreditava-se que um gene autossômico dominante influenciava a densidade mamária. Entretanto, hipóteses envolvendo herança de outros genes (recessivos) não deveriam ser desprezadas (Pankow et al, 1997; Linhares et al, 2005; Ramos, Kemp & Silva, 2006).

Os polimorfismos em genes que regulam a biossíntese e o metabolismo de hormônios esteróides também foram analisados para explicar as variações nos padrões mamográficos. Esses polimorfismos poderiam representar biomarcadores com longo tempo de exposição a hormônios endógenos e potenciais fatores de risco para câncer de mama. A densidade mamária poderia ser hereditária, pelo menos em parte, e múltiplos genes estariam envolvidos (Haiman et al, 2003).

A presença de polimorfismos do receptor para estrogênio tem sido relacionada com o risco para câncer de mama. Observou-se maior densidade mamográfica em mulheres com um ou dois alelos polimórficos. Dessa forma, sugeriu-se que polimorfismos do receptor para estrogênio, presentes naquelas com mamas densas, afetariam o risco para câncer de mama (van Duijnhoven et al, 2005).

Programas de rastreamento mamográfico como medidas de detecção precoce de câncer de mama com acompanhamento genético e nutricional

contribuem para o controle da mortalidade, aumentando a sobrevivência de mulheres (Moody-Ayers et al, 2000).

O sistema BIRADS (*Breast Image Reporting and Data System*) foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, no Brasil, a partir de 1998, sendo a utilização deste, mundialmente aceita e difundida, possibilitando a uniformização e a padronização dos laudos de mamografia (American College of Radiology, 1998).

Na Tabela 1, está apresentado o sistema BIRADS na íntegra.

Tabela 1 – Classificação de exame de mamografia pelo sistema BIRADS

Categoria	Descrição
0	Necessita de exame complementar (ecografia)
1	Exame normal, sem nenhuma alteração
2	Achado benigno, negativo para malignidade
3	Lesão provavelmente benigna, requer controle semestral
4	Lesão provavelmente maligna (4 ^a - com leve suspeita; 4b- com suspeita moderada; 4c- altamente suspeita)
5	Lesão radiologicamente maligna
6	Lesão sabidamente maligna

Modificada de American College of Radiology (1998)

Os padrões mamográficos classificados quanto à densidade do parênquima mamário estão apresentados na Tabela 2. A densidade mamográfica está relacionada às quantidades de tecido adiposo (radiotransparente) e fibroglandular (denso) da mama no exame de mamografia.

Tabela 2 – Categorias da densidade da mama

Categoria	Descrição	Componente fibroglandular (%)
A	Mama predominantemente adiposa	< 25
B	Mama parcialmente gordurosa	26-50
C	Mama com padrão denso e heterogêneo	51-75
D	Mama muito densa	> 75
E	Mama heterogeneamente densa	50-75

Modificada de American College of Radiology (1998)

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estimar a prevalência dos polimorfismos PROGINS e GSTM1 em mulheres afro descendentes procedentes de três comunidades Quilombolas do Estado do Mato Grosso do Sul; e correlacionar os achados moleculares com os dados de investigação clínica e epidemiológica dessa população.

3.2 Específicos

3.2.1 Avaliar as deleções presentes nos genes do receptor de progesterona (PROGINS) e glutathione S-transferase (GSTM1) na população em estudo.

3.2.2 Verificar a associação entre os diferentes genótipos dos polimorfismos PROGINS (presente no gene do receptor de progesterona) e Glutathione-S-Transferase M1 (GSTM1) com outras variáveis: idade da menarca, peso corporal, idade, índice de massa corporal (IMC), história familiar de câncer, amamentação, tabagismo, alcoolismo e densidade mamária.

3.2.3 Caracterizar a população estudada quanto aos fatores de risco não-genéticos para o câncer de mama e quanto ao resultado de exame mamográfico.

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Casuística

O foco do estudo foram as Comunidades Remanescentes de Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul. A Comunidade Quilombola Rural Furnas da Boa Sorte está localizada no Município de Corguinho, a 150 Km de Campo Grande, a Comunidade Quilombola Rural Furnas do Dionísio, no Município de Jaraguari, e a Comunidade Urbana de São Benedito, em Campo Grande, no Estado de Mato Grosso do Sul (MS), sendo que a maioria dos negros dessas regiões vieram do Estado de Minas Gerais, fugindo da escravidão. São comunidades pequenas e fechadas, estando constatado que a maioria dos casamentos é realizada por indivíduos consanguíneos (entre primos).

A Comunidade Furnas do Dionísio está localizada a 48 km de Campo Grande, no Município de Jaraguari. Em consequência dos estudos antropológicos, no ano de 2009, Furnas do Dionísio recebeu a denominação de Remanescente de Quilombolas, para que se pudesse garantir à comunidade, o direito de titulação de terras (INCRA, 2009). É formada por aproximadamente 360 pessoas, distribuídas em 92 famílias.

A Comunidade Furnas da Boa Sorte é formada por 68 famílias, sendo 52 crianças de 0 a 14 anos, 146 pessoas de 15 a 59 anos e 20 acima de 60 anos. E a Comunidade São Benedito está localizada no centro-urbano de Campo Grande, com uma população de mais de 1000 pessoas, sendo constituída por cerca de 115 famílias, formadas por pessoas negras, em sua maioria. Também são consideradas Remanescentes de Quilombolas.

Através do Programa de Atenção à Saúde das Populações Negras e Indígenas – PASNI-MS (Mato Grosso do Sul, 2006), realizado pela Secretaria Estadual de Saúde-MS, constatou-se, entre as mulheres, que não havia programa de prevenção de câncer de mama e de colo do útero. Em relação à coleta de material preventivo, isso só ocorria quando era denotada queixa sintomática. E quando se realizava o preventivo, não era obtido resultado ou quando obtido, não havia retorno ao médico. As mulheres entrevistadas relataram que nunca foram submetidas a exames clínicos de mamas. Outra informação relevante para o estudo é que essas mulheres disseram não ser fumantes, relatando ainda que a amamentação é fato presente nas comunidades.

Conforme recomendações para o Controle de Câncer de Mama do Ministério da Saúde (Brasil, 2005), foram selecionadas mulheres, para estudo, dentro da faixa etária oficialmente priorizada. Mulheres com fator de risco determinante, independente da faixa etária, foram selecionadas para estudo.

Foram avaliadas 101 mulheres negras, sendo 46, da Comunidade Quilombola Furnas do Dionísio, 13, da Comunidade Quilombola Furnas Boa Sorte e 42, da Comunidade Quilombola São Benedito, no período de Novembro de 2009 a Agosto de 2010.

Para cada mulher negra selecionada para estudo, foi aplicado um questionário (Anexo I), para obtenção de dados como idade, idade da menopausa, histórico de doenças endócrinas e/ou outros tipos de câncer, bem como o uso de contraceptivos, fumo, bebida alcoólica; além da realização de medidas antropométricas para cálculo do índice de massa corporal (IMC), a fim de relacioná-los com os eventuais achados do estudo.

Todas as mulheres que participaram do estudo tiveram acesso e concordaram de livre escolha com o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II), sendo que as propostas e objetivos do trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS, bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (Anexo III).

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e Processamento do Material Biológico

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção venosa, utilizando tubo a vácuo, 13X75mm, de 4mL com EDTA.K₃, sendo a coleta realizadas pela equipe formada por profissionais da área de Enfermagem e de Bioquímicos da Secretaria de Saúde dos respectivos municípios que se deslocaram até às comunidades negras selecionadas para estudo. Após a coleta, as amostras foram imediatamente transportadas, em isopor com "gelox", para o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), e em seguida, centrifugadas a uma velocidade de 3000 a 4000 rpm, procedendo-se à separação do creme de leucócitos (células brancas do sangue) com auxílio de uma pipeta automática. A camada de leucócitos separada foi colocada em tubos tipo Ependorf de 2mL, devidamente identificados e depois enviados, em isopor com "gelox", para o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), para análises de polimorfismo.

Entre a separação dos leucócitos (UFMS) até o seu acondicionamento no local da extração de material genômico (UNIFESP), levou-se

um tempo inferior a 24 horas (em gelo), obedecendo o protocolo de que o creme de leucócitos separado pode ser congelado, para análises posteriores de polimorfismo, por um período superior a 5 anos, a uma temperatura de -80°C.

4.2.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo protocolo do Kit GFX® da Amersham-Pharmacia Biotech para células do sangue.

O material celular foi inicialmente centrifugado, desprezando-se o excesso de tampão EDTA (TE). Ao “pellet” celular adicionaram-se 500 µl de “Extraction Solution”, agitando-se até que todo o “pellet” estivesse dissolvido. A solução foi, nesse momento, transferida para a coluna GFX de filtragem e centrifugada a 14.000 rpm/2 minutos, descartando-se o material que passou para o tubo coletor.

Logo depois, adicionou-se nova alíquota de 500 µl de “Extraction Solution” à coluna a qual foi submetida novamente a centrifugação, a 14.000 rpm/2 minutos, desprezando-se o líquido depositado no coletor. Seguiu-se então a adição de 500 µl de “Wash Solution”, com nova centrifugação a 14.000 rpm/3 minutos.

A última etapa consistiu em se adicionar à coluna 70 µl de água milliQ autoclavada pré-aquecida a 70°C, seguida de centrifugação a 14.000 rpm / 1 minuto, coletando-se o eluído em novo microtubo. O DNA assim obtido foi acondicionado em freezer a -20°C e, posteriormente, utilizado na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação do DNA foi utilizada a técnica de PCR nos dois genes estudados. Todas as reações foram realizadas em volume final de 25 µl.

4.2.4 O Polimorfismo PROGINS

O estudo do polimorfismo PROGINS foi efetuado diretamente a partir do produto gerado na reação de PCR e sua leitura feita em gel de agarose 2% (Amershan Pharmacia Biotech) corado com brometo de etídio (1 µg/ml), baseando-se no protocolo para PCR de Wiser et al. 2002.

Tabela 3 – Componentes para a reação de PCR do polimorfismo PROGINS

Componente	Concentração	Volume por reação (µL)
Água	Qsp	11
<i>Primer forward</i>	10 pmol/µL	1
<i>Primer reverse</i>	10 pmol/µL	1
DNA	100ng/µL	2
PCR Master Mix®	*	10
Total	===	25

* PCR Master Mix® (Promega, Madison, USA)= 50U/mL Taq DNA Polimerase, 400µM dDTP, 3mM MgCl₂.

A Tabela 3 apresenta o protocolo de PCR do polimorfismo Progins (Receptor de Progesterona). As reações foram incubadas em termociclador (*Gene Amp PCR System 9700*-Perkin Elmer) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante cinco minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C (desnaturação) por 60 segundos, 55°C (anelamento do *primer*) por 60 segundos e 72°C (extensão da fita do DNA) por 60 segundos, findando com incubação a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das amplificações aplicados em um gel de agarose corado com brometo de etídio foram submetidos à eletroforese por 30 minutos a 90 V em cuba horizontal, contendo tampão de corrida TAE 1X (Tris Acetato 0,04M, EDTA 1mM pH8). A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

Nas reações de amplificação do polimorfismo PROGINS foram utilizados os oligonucleotídeos (iniciadores ou *Primers*) descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Iniciadores ou *Primers* para PCR Master Mix® do polimorfismo PROGINS

GENE	INICIADORES/PRIMERS
PROGINS	<i>Sense</i> : 5'-GGC AGA AAG CAA AAT AAA AAG A - 3'
	<i>Antisense</i> : 5'- AAA GTA TTT TCT TGC TAA ATG TC - 3'
PROGINS (Wiser et al 2002) (Inserção Alu PV/HS-1)	

Com relação ao polimorfismo PROGINS, pode-se observar pela leitura da reação PCR que a presença de uma única banda com 149pb indica indivíduos com os alelos homozigotos livres da mutação e que são denominados P1/P1. Já a presença de uma banda com 149pb e outra com 455pb caracteriza os indivíduos como heterozigotos (um alelo sem a mutação e outro com a mutação), sendo chamados de P1/P2. A presença de uma banda somente de 455pb indica os indivíduos com a mutação em ambos os alelos, sendo designados como P2/P2. Na figura 5, encontra-se a demonstração da descrição desse polimorfismo, com exceção do alelo P2/P2 que não aparece nesta figura.

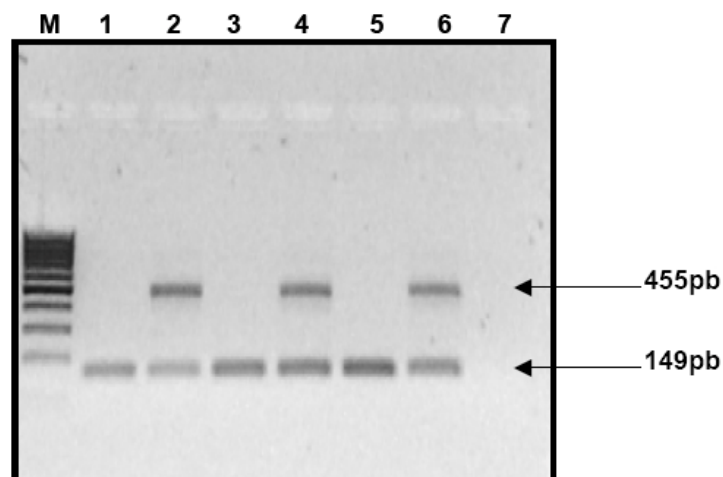


Figura 5 – Foto do Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando polimorfismo do receptor de progesterona (PROGINS). M: marcador de peso molecular de 100pb. Linhas 2, 4 e 6: presença de heterozigose (P1/P2). Linhas 1, 3 e 5: presença de homozigose (P1/P1). Linha 7: controle negativo.

4.2.5 O Polimorfismo da GSTM1

De forma semelhante, o estudo do GSTM1 também foi feito diretamente com os produtos gerados na reação de PCR e analisados em gel de agarose 2% (*Amershan Pharmacia Biotech*) corado com brometo de etídio ($\mu\text{g/ml}$).

O fato do GSTM1 poder apresentar uma deleção homozigótica para os dois alelos fez com fosse utilizado também um controle interno (positivo de DNA). Para tanto, foi introduzido na reação um par de *primers* (oligonucleotídeos) de um gene constitucional (β -Globina), garantindo assim a integridade dos resultados produzidos.

A Tabela 5 mostra os componentes utilizados no estudo do GSTM1 pela técnica de PCR, nas mesmas condições e ciclagem do polimorfismo PROGINS.

Tabela 5 – Componentes para a reação de PCR do polimorfismo GSTM1

Componente	Concentração	Volume por reação (µL)
Água	Qsp	11
Primer GSTM1	10 pmol/µL	1
Primer β-Globina	10 pmol/µL	1
DNA	100ng/µL	2
PCR Master Mix®	*	10
Total	===	25

* PCR Master Mix® (Promega, Madison, USA)= 50U/mL Taq DNA Polimerase, 400µM dDTP, 3mM MgCl₂.

Quando só se observa a banda de 268pb correspondente à β-globina nota-se que o GSTM1 não está presente, sendo, pois denominado de nulo (0/0) (Figura 6).

Os *primers* alelo específicos utilizados para o GSTM1 e a β-Globina, bem como as condições de PCR, foram aquelas já padronizadas por Gattás e Soares Vieira (2000) (Tabela 6).

Tabela 6 – Iniciadores ou *Primers* para PCR do polimorfismo GSTM1 (e β-Globina: controle interno)

GENE	INICIADORES/PRIMERS
	GSTM1:
	<i>Sense:</i> 5' - GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C – 3'
	<i>Antisense:</i> 5' - GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G – 3'
GSTM1	β-Globina:
	<i>Sense:</i> 5' - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC – 3'
	<i>Antisense:</i> 5' - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC – 3'

GSTM1 (Gattás e Soares-Vieira, 2000) (Deleção homozigótica)

Quando se evidenciam as bandas de 268pb e 215pb, verifica-se que a mulher possui o gene para a GSTM1, sendo, portanto considerado como positivo (1/1).

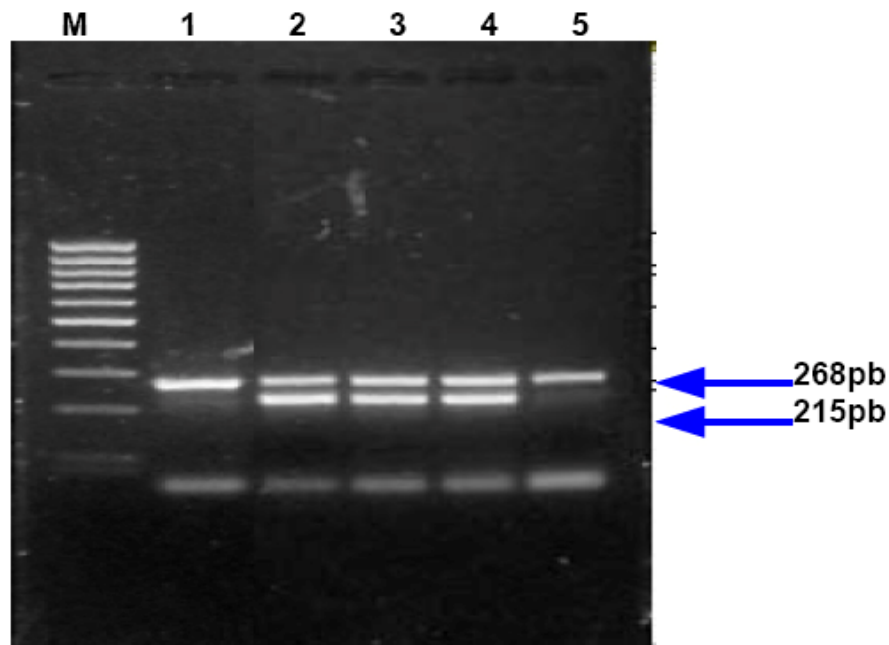


Figura 6 – Foto do Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando polimorfismo do gene da GSTM1. M: marcador de peso molecular de 100pb. Linhas 1 e 5: ausência do gene GSTM1. Linhas 2, 3 e 4: presença do gene GSTM1 e β -globina.

4.2.6 Avaliação Mamográfica

Da população de 101 mulheres selecionadas para o estudo, 43 apresentaram idade acima de 35 anos, estando no grupo de risco de apresentar alteração quanto ao exame de mamografia e densidade mamária. Pela dificuldade encontrada para realizar exame mamográfico na população estudada (local de difícil acesso; cultura e educação das mulheres em aceitar a realização dos exames), foi possível do total dessas 43 mulheres, realizar 17 exames mamográficos com dados conclusivos.

As mulheres foram submetidas à mamografia bilateral, sendo que a densidade mamográfica foi determinada por observadores independentes. Para a classificação da mamografia e da categoria da densidade da mama foram tomados como base os padrões mamográficos do ACR-BIRADS (American College of Radiology, 1998).

4.3 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados obtidos na avaliação da população de mulheres quanto à presença ou não de polimorfismo e as variáveis de estudo, foi utilizado o programa Epi-Info versão 3.5.1 (Division of Public Health Surveillance and Informatics, 2008). Foram utilizados os testes: Qui-quadrado, Exato de Fisher, teste t para comparação entre médias ou Mann Whitney. Foi adotado nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Casuística

Foram estudadas 101 mulheres das comunidades Quilombolas de Furnas da Boa Sorte, de Furnas do Dionísio e da Comunidade São Benedito, no Estado de Mato Grosso do Sul, que apresentaram idade média de $32,87 \pm 14,17$ anos, índice de massa corpórea médio de $26,02 \pm 6,23 \text{ kg/m}^2$, com idade média da menarca de $12,50 \pm 1,30$ anos, 48% das mulheres eram casadas, sendo 52% delas solteiras ou viúvas, com número médio de gestações de $2,19 \pm 2,42$, com taxa média de amamentação de $6,50 \pm 5,50$ meses. Em relação aos hábitos, 64% das mulheres utilizavam algum método contraceptivo, 13% delas eram tabagistas, 35% eram etilistas sociais. Trinta e três por cento das mulheres estudadas tinham algum grau de parentesco com seus maridos e 7% delas tinham história de câncer na família (irmão e pais).

5.2 Polimorfismo GSTM1

Ao analisar-se a frequência do polimorfismo para o gene GSTM1 entre as mulheres estudadas, observou-se maior frequência do genótipo selvagem (genótipo positivo) em relação ao genótipo nulo (Tabela 7).

Tabela 7 – Número e porcentagem de mulheres segundo os tipos de genótipo do polimorfismo GSTM1, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010

Polimorfismo	Genótipo	Nº	%
GSTM1	1/1	99	98
	0/0	2	2
Total		101	100

5.3 Polimorfismo PROGINS

A distribuição genotípica do polimorfismo PROGINS encontra-se na Tabela 8. Foi observada maior frequência do genótipo selvagem (P1/P1) em relação ao genótipo heterozigoto (P1/P2). Nenhum caso de homozigose recessiva (P2/P2) foi observado.

Tabela 8 – Número e porcentagem de mulheres segundo os tipos de genótipo do polimorfismo PROGINS, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul - 2010

Polimorfismo	Genótipo	Nº	%
PROGINS	P1/P1	95	94
	P1/P2	6	6
	P2/P2	0	0
Total		101	100

5.4 Variáveis de estudo – características epidemiológicas

Verificou-se também a existência de associações entre os polimorfismos estudados e as outras variáveis do estudo. Não se observou nenhuma relação entre os polimorfismos estudados e índice de massa corpórea (IMC), idade da menarca, número de gestações e história de câncer na família.

Na Tabela 9, encontra-se o número e porcentagem de mulheres de acordo com os genótipos observados do polimorfismo PROGINS e as variáveis de estudo quanto a antecedente familiar (história de câncer na família, considerando irmãos e pais), índice de massa corpórea (IMC), anos da menarca e número de gestações, na população de Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010 (n=101). O mesmo tipo de análise não pôde ser realizada para o polimorfismo

GSTM1, pois não foram observados casos do genótipo positivo em mulheres segundo as variáveis de estudo.

Tabela 9 – Número e porcentagem de mulheres segundo a presença ou não de polimorfismo e as variáveis de estudo, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010 (n=101)

Variáveis	Polimorfismo PROGINS				Total		p	RP (IC 95%)
	P1/P1		P1/P2					
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Antecedente familiar ⁽¹⁾								
Sim	35	81,4	8	18,6	43	42,6	⁽³⁾ 0,138	0,89 (0,76-1,05)
Não	53	91,4	5	8,6	58	57,4		
IMC ⁽²⁾								
Baixo peso ou Eutrofia	46	95,8	2	4,2	48	47,5	⁽⁴⁾ 0,223	0,96 (0,90 – 1,02)
Sobrepeso ou Obesidade	53	100,0	-		53	52,5		
Anos menarca								
Até 12 anos	50	98,0	1	2,0	51	50,5	⁽⁴⁾ 0,362	1,04 (0,96 – 1,13)
Acima de 12 anos	47	94,0	3	6,0	50	49,5		
Número de gestação								
Até 3 filhos	74	94,9	4	5,1	78	77,2	⁽⁴⁾ 0,617	1,04 (0,91 – 1,19)
Acima de 3 filhos	21	91,3	2	8,7	23	22,8		

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa.

⁽¹⁾ história de câncer na família (irmãos e pais).

⁽²⁾ IMC= índice de massa corpórea.

⁽³⁾ Teste Qui-quadrado.

⁽⁴⁾ Teste de Fisher.

5.5 Avaliação Mamográfica

Todas as mulheres que foram submetidas ao exame de mamografia tinham idade acima de 35 anos e apresentaram resultados de imagem normal (BIRADS 1 - D1 - mama predominantemente adiposa - < 25% de tecido

fibroglandular; ou BIRADS 2 - D2 - mama parcialmente gordurosa - 26-50% de tecido fibroglandular) (American College of Radiology, 1998).

Resultados dos exames mamográficos (densidade mamográfica) foram associados com as variáveis de estudo e polimorfismos obtidos para essa população. A associação entre os polimorfismos PROGINs e GSTM1 e a densidade mamária não apresentou significância. Para um melhor entendimento da natureza multifatorial da análise da densidade mamária, informações adicionais referentes aos polimorfismos estudados foram incluídas no modelo estatístico. Os resultados são sumarizados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Distribuição de mulheres com mais de 35 anos de idade segundo o polimorfismo GSTM1 e PROGINs e os grupos de densidade mamográfica (D1 e D2), Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010 (n=17)

Polimorfismos	Densidades			
	D1 (n=11)		D2 (n=6)	
	Nº.	%	Nº.	%
GSTM1				
1/1 (genótipo selvagem)	11	68,8	5	31,2
0/0 (genótipo nulo)	-	-	1	100,0
PROGINs				
P1/P1 (genótipo selvagem)	11	64,7	6	35,3
P1/P2 (genótipo heterozigoto)	-	-	-	-
P2/P2 (genótipo mutado)	-	-	-	-

Nota: D1= Padrão mamográfico 1 do ACR-BIRADS (mama predominantemente adiposa - < 25% de tecido fibroglandular); D2= Padrão mamográfico 2 do ACR-BIRADS (mama parcialmente gordurosa - 26-50% de tecido fibroglandular).

Na Tabela 10, observa-se que a distribuição do genótipo GSTM1 homozigoto (selvagem), sem deleção genética, foi de 68,8% para as mulheres com padrão mamográfico predominantemente adiposo – D1 (ACR BIRADS 1) e de 31,2% para as mulheres com padrão mamográfico parcialmente gorduroso – D2

(ACR BIRADS 2) de uma população de 16 mulheres com esse genótipo. O genótipo GSTM1 nulo foi encontrado apenas em 1 mulher, que apresentou padrão mamográfico D2, de um total de 17 mulheres submetidas à mamografia, representando 100% da população com genótipo nulo (0/0).

Em relação à PROGINS, a distribuição do seu genótipo homozigoto selvagem (P1/P1) foi de 64,7% para as mulheres com padrão mamográfico D1 do ACR BIRADS e de 35,3% para as mulheres com padrão mamográfico D2. As mulheres negras avaliadas não apresentaram genótipo heterozigoto ((P1/P2) e nem genótipo mutado para o gene PROGINS (P2/P2).

Pela Tabela 11, pode-se verificar que não houve associação positiva ($p>0,05$) entre a densidade mamográfica e as variáveis idade da menarca, peso corporal, paridade, IMC, tabagismo, alcoolismo e história de câncer familiar e de amamentação. Porém houve maior média de idade ($p\leq 0,05$) para as mulheres com padrão mamográfico 2 (D2) do ACR BIRADS.

Tabela 11 – Estatística descritiva das variáveis de estudo segundo a densidade mamográfica (D1 e D2) de mulheres com idade acima de 35 anos, Quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul – 2010

Variáveis	Densidades		Total	p
	D1 (n=11)	D2 (n=6)	(n=17)	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Idade (anos)	11	55,00±9,34	47,47±10,54	⁽⁵⁾ 0,020
Menarca (anos)	12,55±1,04	13,33±1,75	12,82±1,33	⁽⁵⁾ 0,262
Peso	66,18±10,08	77,17±24,19	70,06±16,60	⁽⁵⁾ 0,328
Paridade (nº de filhos)	3,73±2,45	4,50±2,74	4,00±2,50	⁽⁶⁾ 0,559
IMC ⁽¹⁾	25,42±4,62	28,68±12,02	26,57±7,81	⁽⁵⁾ 0,546
	Nº. (%)	Nº. (%)	Nº. (%)	
Antecedente familiar ⁽²⁾				
Sim	4(57,1)	3(42,9)	7(41,2)	⁽⁷⁾ 0,644
Não	7(70,0)	3(30,0)	10(58,8)	
Tabagismo ⁽³⁾				
Sim	4(66,7)	2(33,3)	6(35,3)	⁽⁷⁾ 1,000
Não	7(63,6)	4(36,4)	11(64,7)	
Álcool				
Sim	6(75,0)	2(25,0)	8(47,1)	⁽⁷⁾ 0,620
Não	5(55,6)	4(44,4)	9(52,9)	
Amamentação ⁽⁴⁾				
Sim	10(62,5)	6(37,5)	16(94,1)	⁽⁷⁾ 1,000
Não	1(100,0)	-	1(5,9)	

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. D1= Padrão mamográfico 1 do ACR-BIRADS (mama predominantemente adiposa - < 25% de tecido fibroglandular); D2= Padrão mamográfico 2 do ACR-BIRADS (mama parcialmente gordurosa - 26-50% de tecido fibroglandular).

⁽¹⁾ IMC= índice de massa corpórea

⁽²⁾ história de câncer na família (irmãos e pais)

⁽³⁾ consumo de até 20 cigarros/dia

⁽⁴⁾ 6-12 meses

⁽⁵⁾ Teste t

⁽⁶⁾ Teste Mann Whitney

⁽⁷⁾ Teste Exato de Fisher

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, preocupou-se em analisar a presença de eventuais relações entre polimorfismos presentes nos genes do receptor de progesterona (PROGINS) e GSTM1, bem como os fatores clínicos e suas possíveis associações com a densidade mamográfica em mulheres afro descendentes.

O estudo demonstrou que polimorfismos presentes em genes envolvidos na ação e metabolização dos esteróides sexuais parecem não exercer influência no surgimento de condições patológicas como o câncer de mama na população estudada.

Ao final da presente investigação, não foi encontrada uma associação significativa entre a frequência do polimorfismo PROGINS e antecedentes de câncer na família.

Com relação aos polimorfismos presentes no gene GSTM1, também não foram observadas associações significativas entre sua prevalência as variáveis de risco analisadas, sugerindo que os mesmos não apresentam uma participação importante no desenvolvimento de câncer de mama na população estudada.

Não se observou nenhuma relação entre os polimorfismos estudados e o índice de massa corpórea (IMC), idade da menarca, número de gestações e história de câncer na família.

Em relação à variável raça, a sua classificação no Brasil é extremamente difícil, devido à intensa miscigenação como comprovam os resultados de Parra et al (2003). Diante disso, o presente estudo é pioneiro no estudo genético da população Quilombola, pois se trata de uma população que

habita uma comunidade isolada, fechada, onde ocorrem casamentos entre pessoas consanguíneas, praticam agricultura rudimentar, e por ser região de difícil acesso não há nas proximidades grandes lavouras com uso de inseticidas, pesticidas ou agrotóxicos.

Em relação às condições estrogênio-dependentes, estudos Brasileiros do grupo de pesquisas do Departamento de Ginecologia da UNIFESP, mostraram associação significativa entre PROGINS e patologias ginecológicas como a endometriose (Carvalho et al, 2007), bem como PROGINS e miomatose uterina (Gomes et al, 2007) e PROGINS e o carcinoma de endométrio (Junqueira et al, 2007).

O polimorfismo PROGINS foi identificado por Rowe et al (1995) em estudo com câncer de ovário esporádico. Segundo os mesmos autores, embora esse polimorfismo ocorra em um íntron, é provável que essa inserção possa alterar a expressão do locus do receptor de progesterona. Esse polimorfismo, ao que parece, determina a transcrição anômala no gene do receptor de progesterona, pela recombinação ou por um erro no processamento do transcrito primário (McKenna et al, 1995).

Além disso, dados da literatura indicam que a isoforma A do receptor de progesterona seria a proteína que estaria associada ao PROGINS, favorecendo a estabilidade do RNA mensageiro dessa isoforma, aumentando assim a sua atividade transcricional (Vegato et al, 1993).

Tal fato poderia causar o inadequado controle do receptor de estrogênio e da isoforma B do receptor de progesterona, podendo elevar o risco do desenvolvimento do carcinoma de ovário (Kieback et al, 1998).

Em contrapartida, análises mostraram que a perda de parte do domínio de ligação resulta em um decréscimo da regulação da atividade transcricional da progesterona, com redução da ação de progestinas na presença do polimorfismo. Realmente, o complexo PROGINS se localiza perto do domínio de ligação do hormônio, entre os éxons 4 e 8, podendo influenciar nos níveis de progesterona circulantes (Romano et al, 2007; Terry et al, 2005).

Apesar disso, no presente trabalho, não se observou uma associação significativa entre a frequência do polimorfismo PROGINS e antecedentes de câncer na população estudada. O genótipo mutado foi observado com uma frequência muito baixa no grupo estudado. Estudos em pacientes com câncer de ovário (Leite et al, 2008) mostram que mulheres com antecedentes familiares apresentam 4,69 mais chances de apresentar pelo menos um alelo mutado quando comparados com pacientes sem antecedência familiar ($p=0,01^*$).

A presença do polimorfismo PROGINS, o qual altera a função do receptor, provavelmente causa um distúrbio nos níveis hormonais da célula, podendo também modular o risco para desordens ginecológicas malignas e benignas. Entretanto, o efeito do alelo PROGINS permanece incerto. Acredita-se que a presença do alelo PROGINS pode levar a uma resposta da progesterona e uma proliferação sem controle das células epiteliais ovarianas, favorecendo o desenvolvimento de neoplasias como a de ovário. Fato que, poderia explicar em parte a baixa frequência deste alelo na população estudada que possui pouco antecedente familiar.

Diversos estudos avaliaram a possível associação entre o câncer de ovário e o polimorfismo PROGINS, os quais incluem a variante V660L, H770H e a inserção Alu. Alguns deles não encontraram aumento no risco associado à

presença do alelo mutado (Manolitsas et al, 1997; Lancaster et al, 1998; Tong et al, 2001; Spurdle et al, 2001; Lancaster et al, 2003).

Entretanto, outros estudos encontraram associação positiva entre o polimorfismo PROGINs e o câncer de ovário (McKenna et al, 1995; Runnebaum et al, 2001; Agoulinik et al, 2004; Pearce et al, 2005; Romano et al, 2006, Leite et al, 2008).

Recentemente, um trabalho britânico envolvendo 4788 casos de câncer de ovário e 7614 controles obtidos de 12 estudos caso-controle diferentes encontrou associação entre o alelo PROGINs e o risco do desenvolvimento do câncer de ovário do tipo endometrióide.

Cabe destacar que dentre os 12 estudos, 5 deles apresentavam média de idade das mulheres do grupo controle entre 48,4 e 54,4 anos e sempre maior que o grupo caso; sem que a confiabilidade dos dados fosse questionada (Pearce et al, 2008).

Existem várias razões para os achados negativos, tais como: amostras reduzidas que limitam o estudo, amostras tendenciosas e seleção de grupos controle ao quais não são representativos da população (Modugno, 2004).

Apesar de estudos terem reportado a presença de estrogênio e receptores de progesterona em variadas concentrações em tecidos ovarianos normais e cancerosos, o papel do estrogênio na carcinogênese e no desenvolvimento do câncer ginecológico ainda permanece incerto (Wu et al, 2005).

O efeito proliferativo dos estrogênios tem sido demonstrado em diferentes linhagens de células cancerosas positivas para o ER. Os estrogênios podem afetar a progressão tumoral pelo aumento da proliferação bem como

promover invasão ou mobilidade celular. No entanto, o papel dos receptores de estrogênio na mediação desse efeito mitogênico ainda não foi estabelecido (Cunat et al, 2004).

Os dados aqui descritos, com relação ao polimorfismo no receptor de progesterona (PROGINS), concordam com a literatura que descreve que progesteronas e estrogênios parecem estar relacionados ao câncer através de vias mediadas por seus receptores (Sellers et al, 2005).

De fato, os resultados da presente pesquisa são similares a outros estudos que se propuseram a investigar uma possível relação entre os polimorfismos nos genes GST e COMT e os cânceres ginecológicos. Goodman et al (2000) não encontraram associação em um estudo caso-controle composto por 108 casos e 106 controles. Esta falta de associação não variou com a idade, histórico familiar, tipo histológico do tumor ou genótipo GSTT1 ou GSTM1.

Um estudo com mulheres havaianas também não encontrou nenhum efeito do polimorfismo COMT sobre o carcinoma ovariano, apesar de que mulheres fumantes e com o alelo COMT Met tiveram um elevado risco no desenvolvimento de tumores ovarianos boderline (OR, 2.2; 95% CI, 1.0-4.7) (Goodman et al, 2001).

Garner et al (2002) também não observaram efeito da variante polimórfica sobre a doença em estudo na EUA com uma população de 240 casos e 240 controles. Entretanto, notaram uma associação inversa no grupo de pacientes com tumores mucinosos, ou seja, a presença da mutação Val/Met diminuiu o risco de desenvolvimento desses tumores (RR, 0.28; 95% CI, 0.13-0.61).

Com relação ao polimorfismo do gene GSTM1, não foi encontrada diferença estatística, tanto nas frequências genotípicas, como no cálculo do risco para associação de neoplasia ginecológica estrogênio-dependente.

Sarhanis et al (1996) buscaram identificar uma possível influência do GSTM1, GSTT1 e CYP2D6 em pacientes com câncer de ovário, além de buscar uma associação com a expressão da proteína p53 (84 casos e 325 controles). Os dados apresentados não mostraram associação entre os genótipos estudados e o câncer. No entanto, o genótipo nulo encontrou-se associado ao câncer ovariano nas pacientes que super expressam a p53.

Hengstler et al (1998) não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso (103 pacientes) e controle (115 pacientes) entre os genótipos 0/0 para GSTM1 e GSTT1 e o carcinoma de ovário. Lallas et al (2000) também concluíram que o genótipo nulo para GSTM1 não aumenta o risco no desenvolvimento do câncer de ovário em estudo com 80 controles e 33 casos.

Entretanto, Baxter et al (2001) encontraram associação positiva entre o genótipo nulo e o câncer de ovário ($p=0,025$) em estudo com 293 casos e 219 controles.

Spurdle et al (2001) não encontraram associação entre os polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 e o câncer. No entanto, encontraram associação positiva entre o genótipo nulo GSTM1 e o aumento do risco de desenvolvimento do câncer de ovário tipo endometrióide/células claras, sugerindo também que o genótipo nulo poderia estar associado a subtipos específicos de carcinomas de ovário.

Coughlin, Hall (2002) em uma revisão de literatura afirmam não haver associação positiva entre o genótipo nulo GSTM1 e o desenvolvimento do carcinoma de ovário. Os resultados do presente estudo se mostraram consoantes com a maioria dos estudos já realizados. Não foi observada uma frequência significativa do genótipo 0/0 entre pacientes com carcinoma de ovário.

Uma vez que a carcinogênese é influenciada por vários genes, uma única variante polimórfica possui, individualmente, um efeito pequeno, mas o risco populacional atribuído a tais genes de suscetibilidade pode ser grande e deve ser levado em consideração, justificando a realização da análise de várias variantes simultaneamente (Norppa, 2003).

Estudos genotípicos têm sugerido que os indivíduos com deleções homozigóticas do gene GSTM1 apresentam um alto risco de desenvolver vários tipos de neoplasias. Mitrunem & Hirvonen (2003) observaram um efeito protetor quando o gene GSTM1 está presente. No presente estudo, pode-se observar que a deleção homozigótica dos genes GSTM1 e a categoria da densidade mamográfica das mulheres negras avaliadas não apresentaram associação com a susceptibilidade ao câncer de mama pois mais de 90% dessa população apresentou mamografia normal e sem deleção homozigótica para esse gene.

Frequências genotípicas observadas para o polimorfismo PROGINs têm sido reportadas pela sua susceptibilidade em causar câncer de mama (Fabjani et al. 2002; Linhares et al. 2005; Romano et al. 2006 e 2007). No presente estudo, ao avaliar a etnia negra (n=17), observou-se que para o polimorfismo PROGINs, os genótipos heterozigoto P1/P2 e mutado P2/P2 estavam ausentes nas mulheres com mamografia no padrão 1 e 2, considerados normais para densidade de mama, não havendo assim, associação positiva ao considerar esses fatores.

Em estudo associando a etnicidade e frequência de polimorfismos GSTM1, Gattás et al. (2004) indicaram um gradiente de distribuição do genótipo homozigótico nulo em uma população brasileira, sendo 55,6% para brancos, 40,4% para mulatos claros, 32,0% para mulatos escuros e 28,6% para negros, concluindo no entanto que é importante levar em consideração as diferentes características e contextos culturais de cada população.

Apesar da frequência do genótipo GSTM1 nulo em negros variar de 20 a 31% (Losi-Guembarovski & Cólus, 2001; Gattás & Soares-Vieira, 2002; Gattás et al. 2004), as mais altas frequências para o genótipo GSTM1 nulo descritas na literatura (88-100%) são referentes a estudos realizados com indivíduos do Pacífico Sul. Isso provavelmente se deve ao fato de que estas populações permanecerem isoladas durante um longo período, sob os efeitos da endogamia e da deriva genética.

O risco de câncer de mama aumenta com a idade, pela exposição das mulheres aos seus próprios hormônios sexuais ou outros fatores, sendo que o câncer é raro antes de 35 anos de idade e a sua incidência aumenta rapidamente em mulheres acima dessa faixa etária (Colditz et. 1993). No presente estudo observou-se que houve maior média de idade para as mulheres com D2 (padrão mamográfico 2 do ACR-BIRADS: mama parcialmente gordurosa - 26-50% de tecido fibroglandular) do que com D1 (padrão mamográfico 1 do ACR-BIRADS: mama predominantemente adiposa - < 25% de tecido fibroglandular) ($p=0,020$), mostrando resultados que estão de acordo com os estudos já reportados embora a população estudada não se encontre na faixa de risco para desenvolver a doença. Assim, foi verificado que o grupo de mulheres com média de idade=43,36 tinha densidade mamária menor que a do grupo com média de idade=55,00, sendo

condizente com fato observado por outros autores (Ramos et al. 2006; Colditz et al. 1993; Anton et al. 2010).

O aumento no peso pode levar à diminuição da densidade mamográfica (Ramos et al. 2006). No presente trabalho, foi observado que as mulheres com média de IMC= 28,68 e peso corporal= 77,17 tinham maior densidade mamográfica do aquelas com média de IMC= 25,42 e peso corporal= 66,18; porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Uma menarca precoce pode estar associada a um início mais rápido nos ciclos ovulatórios e assim, a uma exposição maior aos hormônios endógenos e essa situação leva a uma maior proliferação epitelial (Ramos et al. 2006; Siqueira et al. 2004). Não encontramos associação significativa entre idade da menarca e densidade mamográfica aumentada ($p= 0,262$).

Com o aumento na paridade, as células epiteliais encontram-se mais diferenciadas e menos proliferativas, levando radiologicamente a uma diminuição na densidade mamográfica (American College of Radiology, 1998). No presente trabalho, foi verificado que essa relação entre paridade e densidade mamográfica se mostrou diferença estatisticamente não significativa ($p=0,559$).

Observa-se que a incidência de câncer de mama é mais baixa em populações em que a amamentação é prolongada. Ao avaliar a possibilidade de associação entre densidade mamográfica e período de amamentação (6-12 meses), não encontramos relação com diferença significativa ($p=1,000$).

A relação entre mulher fumante ativa e risco para câncer de mama também foi avaliada. Embora haja relatos de que o uso de cigarro na adolescência (quando o tecido mamário seria mais sensível a influências de agentes

carcinogênicos) estaria relacionado a um risco aumentado para câncer de mama, não encontramos uma associação estatisticamente significativa entre densidade mamográfica e tabagismo ($p=1,000$).

A análise dos parâmetros clínicos no que se refere ao histórico de antecedente familiar (história de câncer na família) e consumo de álcool (etilismo ou alcoolismo) também são fatores que podem estar envolvidos, determinando a densidade mamária. No presente estudo não foi encontrada, para esses dois parâmetros, uma relação com densidade mamográfica, estatisticamente significativa, com valores de p respectivamente, de 0,644 e 0,620, para história de câncer e alcoolismo.

7. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos polimorfismos PROGINS e GSTM1 e antecedentes de câncer na população estudada.

Não se observou qualquer relação entre os polimorfismos estudados e o índice de massa corpórea (IMC), idade da menarca, número de gestações e história de câncer na família.

Não foi observada correlação entre as densidades mamárias das pacientes estudadas e a prevalência dos polimorfismos PROGINS e GSTM1.

Ao final das análises, não foram encontradas associações significativas entre a prevalência dos polimorfismos presentes nos genes PROGINS e GSTM1 e as variáveis de risco estudadas, sugerindo que os mesmos não apresentam uma participação importante no desenvolvimento de câncer, na população estudada.

8. REFERÊNCIAS

Agoulinik IU, Tong XW, Fischer DC, Korner K, Atkinson NE, Edwards DP, et al. A germline variation in the progesterone receptor gene increases transcriptional activity and may modify ovarian cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(12):6340-7.

American College of Radiology. Illustrated breast imaging reporting and data system (BIRADS). Reston: American College of Radiology. 3th edition, 1998.

Andrade Filho JB. Variação lingüística: o caso de Furnas da Boa Sorte. 104f. [dissertação – Mestrado]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas-MS, 2007.

Ansolin PL, Damini DC, Alexandre COP. Polimorfismos das isoformas M1, T1 e P1 da glutathione S-transferase e associação com os aspectos clínico-patológicos no carcinoma colorretal. *Rev Bras Colo-proctol*. 30(3), 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-98802010000300003&lng... Acesso em: 28.01.2011.

Baxter SW, Thomas EJ, Campbell IG. GSTM1 null polymorphism and susceptibility to endometriosis and ovarian cancer. *Carcinogenesis*, 2001;22(1):63-5.

Beeghly A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, Risch H, Jones B, Yu H. Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol*. 2006;100(2):330-7.

Bell AC, GE K, Popkin BM. The road to obesity or the path to prevention: motorized transportation and obesity in China. *Obes Res*. 2002; 10(4):227-83.

Bosetti C, Altieri A, La Vecchia C. Diet and environmental carcinogenesis in breast/gynaecological cancers. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2002, 14:13-18.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008 – Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2007. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/conteudo_view.asp?ID=7. Acesso em: 30 de julho de 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010 – Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Plano de ação para o controle dos cânceres do colo do útero e da mama 2005-2007. Diretrizes estratégicas. Brasília: INCA, 2005.

Brekelmans CTM. Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2003; 15:63-68.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*. 1999; 424(1-2):9-21.

Carvalho CV, Nogueira de Souza NC, Costa AMM, Baracat EC, Girão MJBC, D'Amora P, Schor E, Da Silva IDC. Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17 α (CYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk. *Gynecological Endocrinol* 2007;23(1):29-33.

Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(20):10937-42.

Coughlin SS, Hall IJ. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer: a HuGE review. *Genet Med* 2002; 4(4):250-7.

Cunat S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 94(1):25-32.

De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res* 2003; 63: 5236-5238.

Division of Public Health Surveillance and Informatics. Epi Info, versão 3.5.1, 13 agosto 2008. Disponível em <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 29 ago. 2008.

Du W, Simon MS. Racial disparities in treatment and survival of women with stage I-III breast cancer at a large academic medical center in metropolitan Detroit. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2005; 91:243-248.

Edwards QT, Li AX, Pike MC, Kolonel LN, Ursin G, Henderson BE, McKean-Cowdin R. Ethnic differences in the use of regular mammography: the multiethnic cohort. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009, v.115, p. 163-170.

Fabjani G, Tong D, Czerwenka K, Schuster E, Speiser P, Leodolter S, Zeillinger R. Human progesterone receptor gene polymorphism PROGINS and risk for breast cancer in Austrian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 72(2):131-7.

Feigelson HS, Henderson BE. Future possibilities in the prevention of breast cancer: role of genetic variation in breast cancer prevention. *Breast Cancer Res.* 2000; 2(4):277-82.

Garner EI, Stokes EE, Berkowitz RS, Mok SC, Cramer DW. Polymorphisms of the estrogen-metabolizing genes CYP17 and catechol-O-methyltransferase and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2002; 1;62(11):3058-62.

Gattás GJF, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup Med (Lond)*.

2000; 50(7):508-11.

Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MAV. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37:451-458.

Gomes MT, Castro Rde A, Villanova FE, da Silva ID, Baracat EC, de Lima GR, Girão MJ. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGINS, may be a factor related to the development of uterine fibroids. *Fertil Steril* 2007; 87(5):1116-21.

Goodman JE, Lavigne JA, Hengstler JG, Tanner B, Helzlsouer KJ, Yager JD. Catechol-O-methyltransferase polymorphism is not associated with ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(12):1373-6.

Goodman MT, McDuffie K, Guo C, Terada K, Donlon TA. CYP17 genotype and ovarian cancer: a null case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10(5):563-4.

Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, Singh HR, Olson LK, Gatewood O, et al. Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Investigators. *Ann Intern Med* 1999; 130: 262-269.

Haiman CA, Bernstein L, Berg D, Ingles SA, Salane M, Ursin G. Genetic determinants of mammographic density. *Breast Cancer Res* 2002; 4: R5.

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

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:51-88.

Hengstler JG, Kett A, Arand M, Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F, Pilch H, Tanner B. Glutathione S-transferase T1 and M1 gene defects in ovarian carcinoma. *Cancer Lett.* 1998; 14;130(1-2):43-8.

Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. The novel exon, exon T, of the human progesterone receptor gene and the genomic organization of the gene. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 80(3):365-7.

Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Tsai HD, Yeh LS, Lin CC, Tsai CH. Estrogen receptor thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism is associated with susceptibility to leiomyoma. *Fertil Steril.* 2003; 79(1):96-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatística/população/trabalhoerendimento/pna2003/saúde/saude2003.pdf>. Acesso em: 24/02/07.

Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária – INCRA. O Incra reconhece e declara como território da Comunidade Remanescente de Quilombo Furnas do Dionísio a área de 1.018,2796 hectares. Portaria nº 118, de 24 de abril de 2009, Publicado no Diário Oficial da União de 27.04.2009.

Jakimiuk A, Nowicka M, Bogusiewicz M, Adamiak A, Skorupski P, Miotla P, et al. Prevalence of estrogen receptor alpha PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007; 45(4):331-8.

Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg.* 2003;73(7):517-22.

Junqueira MG, da Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Carvalho CV, Leite DB, Gomes MTV, et al. Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of endometrial cancer development. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17:229-32.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P: Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 1990; 9:1603-14.

Kieback DG, Tong XW, Weigel NL, AgoulNIK IU. A genetic mutation in the progesterone receptor (PROGINS) leads to an increased risk of non-familial breast and ovarian cancer causing inadequate control of estrogen receptor driven proliferation [abstract]. *J Soc Gynecol Invest.* 1998; 5:40a.

Koifman S. Incidência do câncer no Brasil. In: Mainayo MCS. Os muitos Brasis: saúde e população na década de 80. 2ª ed. São Paulo: Hucitec; Rio de Janeiro: Abrasco, 1999.

Kurz C, Tempfer CB, Boeskoer S, Unfried G, Nagele F, Hefler LA. The PROGINS progesterone receptor gene polymorphism and idiopathic recurrent miscarriage. *J Soc Gynecol Investig.* 2001; 8(5):295-8.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000. 74(5): 311-7.

Kwak MK, Egner PA, Dolan PM, Ramos-Gomez M, Groopman JD, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutation Research,* 2001; 480-1:305-15.

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

Lallas TA, McClain SK, Shahin MS, Buller RE. The glutathione S-transferase M1 genotype in ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(6):587-90.

Lancaster JM, Berchuck A, Carney ME, Wiseman R, Taylor JA. Progesterone

receptor gene polymorphism and risk for breast and ovarian cancer. *Br J Cancer*, 1998;78(2):277.

Lancaster JM, Wenham RM, Halabi S, Calingaert B, Marks JR, Moorman PG, et al. No relationship between ovarian cancer risk and progesterone receptor gene polymorphism in a population-based, case-control study in North Carolina. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(3):226-7.

Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ.* 1999; (148):13-22.

Leal ST, Santos KRRA, Maia HGS. Características epidemiológicas do câncer de mama no estado da Paraíba. *Rev Bras Matologia*, 2002; 12(2):15-22.

Leite DB, Junqueira MG, de Carvalho CV, Massad-Costa AM, Gonçalves WJ, Nicolau SM, Lopes LA, Baracat EC, da Silva ID. Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of ovarian cancer. *Steroids*, 2008;73(6):676-80. Epub 2008 Feb 23.

Li Y, Shouten EG, Hu X, Cui Z, Luan D, Ma G. Obesity prevalence and time trend among youngsters in China, 1982-2002. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008; 17(1): 131-37.

Li X, O'Malley BW. Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol Chem.*2003;10;278(41):39261-4.

Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000;21(1):40-54.

Lillie EO, Bernstein L, Ingles SA, Gauderman WJ, Rivas GE, Gagalang V, et al. Polymorphism in the androgen receptor and mammographic density in women taking and not taking estrogen and progestin therapy. *Cancer Res* 2004;64: 1237-1241.

Lima GR, Girão M, Baracat EC (Org.). *Ginecologia de Consultório*. São Paulo: Atheneu, 2003, v1.

Linhares JJ, Silva IDCG, Souza NCN, Noronha EC, Ferraro O, Baracat FF. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com câncer de mama. Estudo caso-controle. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2005; 27(8): 473-8.

Losi-Guembarovski R, Cólus IMS. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1): distribuição étnica e relação com câncer. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, 2001; 22:3-9.

Majewski J, Ott J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res.* 2002 Dec;12(12):1827-36.

- Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J.* 1992; 282:305-6.
- Manolitsas TP, Englefield P, Eccles DM, Campbell IG. No association of a 306-bp insertion polymorphism in the progesterone receptor gene with ovarian and breast cancer. *Br J Cancer*, 1997; 75(9):1398-9.
- Margolis RN, Evans RM, O'Malley BW, Nursa Atlas Consortium. The nuclear receptor signaling atlas: development of a functional atlas of nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* 2005; *On line*, July, 28.
- Maskarinec G, Lurie G, Williams AE, Le Marchand L. An investigation of mammographic density and gene variants in healthy women. *Int J Cancer* 2004; 112: 683-688.
- Mato Grosso do Sul. Secretaria Estadual da Saúde. Coordenadoria de Epidemiologia e Promoção à Saúde. Programa de Atenção à Saúde das Populações Negras e Indígenas – PASNI/MS. Relatório da Ação Popular realizada no dia 18 de Abril de 2006 e 16 de Maio de 2006.
- McKenna NJ, Kieback DG, Carney DN, Fanning M, McLinden J, Headon DR. A germline TaqI restriction fragment length polymorphism in the progesterone receptor gene in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 1995; 71(3):451-5.
- Michaelson, J.S.; Satija, S.; Moore, R.; Halpern, E.; Garland, A. et al. The pattern of breast cancer screening utilization and its consequences. *Cancer.* 2002, v.2002, n.94, p.37-42.
- Mitrunen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res.* 2003; 544(1):9-41.
- Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;15;159(4):319-35.
- Moody-Ayers SY, Wells CK, Feinstein AR. "Benign" tumors and "early detection" in mammography-screened patients of natural cohort with breast cancer. *Arch Internal Medicin.* 2000; 16(8): 1109-1115.
- Morais LMTS. Características mamográficas do câncer de mama associadas aos polimorfismos GSTM1 e GSTT1. *Rev Assoc Med Bras.* 2008; 54(1):
- Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutation Research* , 2003; 544:339-48.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson: genética médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.69-82

Oliveira Júnior FJM, Cesse EAP. Morbi-mortalidade do câncer na cidade do Recife na década de 90. *Rev Bras Cancerol.* 2005; 51(3):201-208.

Pankow JS, Vachon CM, Kuni CC, King RA, Arnett DK, Grubbs DM, et al. Genetic analysis of mammographic breast density in adult women: evidence of a gene effect. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(8): 549-56.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;7,100(1):177-82. Epub 2002 Dec 30.

Paulinelli RR, Freitas Junior R, Curado MP, Souza AA. A situação do câncer de mama em Goiás, no Brasil e no mundo: tendências atuais para a incidência e mortalidade. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 2003; 3(1):17-24.

Pearce CL, Hirschhorn JN, Wu AH, Burt NP, Stram DO, Young S, Kolonel LN, Henderson BE, Altshuler D, Pike MC. Clarifying the PROGENS allele association in ovarian and breast cancer risk: a haplotype-based analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(1):51-9.

Pearce CL, Wu AH, Gayther SA, Bale AE, Beck PA, Beesley J, et al. Ovarian Cancer Association Consortium. Progesterone receptor variation and risk of ovarian cancer is limited to the invasive endometrioid subtype: results from the Ovarian Cancer Association Consortium pooled analysis. *Br J Cancer* 2008 29;98(2):282-8.

Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* , 2004; 4(11):850-60.

Política Nacional de Atenção Oncológica. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 2.439, de 8 de Dezembro de 2005. [Diário Oficial da União – Edição nº 236 de 09/12/2005].

Ramos EHM, Kemp C, Silva IDCG. Associação entre os polimorfismos HaeIII e MspI do gene para o receptor alfa de estrogênio e densidade mamográfica em mulheres após a menopausa . *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28 (10): 581-89.

Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review. *Gene* 1995;159(1):113-21.

Ries L., Eisner M, Kosary C. Cancer statistics review - 1973-1998. Bethesda: National Cancer Institute, 2001.

Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P. The PROGENS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J Mol Endocrinol* 2007;38(1-2):331-50.

Romano A, Lindsey PJ, Fischer DC, Delvoux B, Paulussen AD, Janssen RG, Kieback DG. Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or

ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;101:287-295.

Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, Gallo CV, Pinto LF. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res.* 2002; 1(3):233-40.

Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ, Garrett E, Kieback DG, Carney DN, Headon DR. Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res.* 1995; 55(13):2743-5.

Runnebaum IB, Wang-Gohrke S, Vesprini D, Kreienberg R, Lynch H, Moslehi R, et al. Progesterone receptor variant increases ovarian cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers who were never exposed to oral contraceptives. *Pharmacogenetics* 2001; 11(7):635-8.

Salles V. O negro no Pará: sob o regime da escravidão. Rio de Janeiro, Coleção Amazônica, 1973.

Salles V. O negro no Pará: sob o regime da escravidão. 3. ed. Belém: IAP, 2005.

Sarhanis P, Redman C, Perrett C, Brannigan K, Clayton RN, Hand P, et al. Epithelial ovarian cancer: influence of polymorphism at the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 loci on p53 expression. *Br J Cancer*, 1996;74(11):1757-61.

Schwarcz L M. O espetáculo das raças: cientistas, instituições e questão racial no Brasil – 1870-1930. São Paulo: Companhia das Letras, 1993.

Sellers TA, Schildkraut JM, Pankratz VS, Vierkant RA, Fredericksen ZS, Olson JE, et al. Estrogen bioactivation, genetic polymorphisms, and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(11 Pt 1):2536-43.

Silva A C. A discriminação do negro no livro didático. 2. ed. Salvador: EDUFBA, 2004.

Silva JM. Quilombos do Brasil Central: Violência e Resistência Escrava. Goiânia: Kelps, 2003.

Simon MS, Korczk JF, Yee CL et al. Racial differences in the familial aggregation of breast cancer and other female cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2005; 89:227-235.

Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. No significant association between progesterone receptor exon 4 Val660Leu G/T polymorphism and risk of ovarian cancer. *Carcinogenesis*, 2001; 22(5):717-21.

Storn HH, Nielsen NH, Prener A, Jensen OM. A comparison of cancer in Greenland and Denmark: a study based on routinely collected incidence data 1973-1985, using the

Danish population as baseline. Em: proceedings of the 8th International Congress on Circumpolar Health. Whitehorse, Yukon: University of Manitoba Press, 1990. pp. 4700471.

Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. IARC Sci Publ 1999;(148):231-49.

Sundfeld CA (org). Comunidades Quilombolas: Direito à Terra. Brasília.Fundação Cultural Palmares / MinC / Editorial Abaré, 2002.

Syvänen AC. Toward genome-wide SNP genotyping. Nat Genet. 2005; 37 Suppl:S5-10.

Taborda W C, Ferreira SC, Rodrigues D, Stávale JN, Baruzzi RG. Rastreamento do câncer de colo uterino em índias do Parque Indígena do Xingu, Brasil central. Rev. Panam. Salud Publica, 2000; 7(2):92-96.

Tammemagi CM, Nerenz D, Neslund-Dudas C, Feldkamp C, Nathanson D. Comorbidity and survival disparities among black and white patients with breast cancer. Journal of American Medical Association, 2005; 294(14):1765-1772.

Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. Mutat Res. 1999; 436(3):227-61.

Telles E E. Racismo à brasileira: uma nova perspectiva sociológica. Tradução: Nadjeda Marques e Camila Olsen. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 2003.

Thompson PA, Ambrosone C. Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in human breast cancer. J Natl Cancer Inst Monogr 2000; (27):125-34.

Thuler LCS, Mendonça GA. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2005; 27(11):656-660.

Tong D, Fabjani G, Heinze G, Obermair A, Leodolter S, Zeillinger R. Analysis of the human progesterone receptor gene polymorphism progins in Austrian ovarian carcinoma patients. Int J Cancer, 2001;20;95(6):394-7.

Torresan C, Oliveira MMC, Torresan GT, Oliveira SFV, Abuázar CS, Cavalli IJ, Ribeiro EMSF. Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. Clin Exp Med. 2008; 8:65-71.

van Duijnhoven FJ, Bezemer ID, Peeters PH, Roest M, Uitterlinden AG, Grobbee DE, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and mammographic

- density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14 (11 Pt 1): 2655-60.
- Vegato E, Shahbaz MM, Wen DX. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7:1244-55.
- Vergolino-Henry A, Figueiredo AN. A presença africana na Amazônia Colonial: uma notícia histórica. Belém: Arquivo Público do Pará, 1990.
- Wang-Gohrke S, Chang-Claude J, Becher H, Kieback DG, Runnebaum IB. Progesterone receptor gene polymorphism is associated with decreased risk for breast cancer by age 50. *Cancer Res.* 2000; 60:2348-50.
- Wasserman SW, Flatt, Natarajan L, Laughlin G, Matusalem M, Faerber S, Rock CL, Barrett-Connor E, Pierce JP. Correlates of obesity in postmenopausal women with breast cancer: comparison of genetic demographic, disease-related, life history and dietary factors. *Internat J Obesity.* 2004; 28: 49-56.
- Wieser F, Schneeberger C, Tong D, Tempfer C, Huber JC, Wenzl R. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril* . 2002; 77(2):309-12.
- World Health Organization (WHO) [homepage on the Internet]. World health statistics annual: 1997-1999. WHO; 2001 [accessed in 2006 Dec 20]. Available from: <http://www.who.int/en/>
- Wu HJ, Sekine M, Kashima K, Hirai Y, Hatae M, Kobayashi I, et al. Japanese Familial Ovarian Cancer Study Group. Mutational analysis of the estrogen receptor-alpha gene in familial ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005;31(5):375-83.
- Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36:203-32.
- Young KT, Choi NW. Cancer risk among residents of Manitoba Indian reserves, 1970-1979. *Canadian Medic Assoc J.* 1985; 132(11):1269-1273.
- Zhong SL, Zhou SF, Chen X, Chan SY, Chan E, Ng KY, Duan W, Huang M. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. *Eur J Pharm Sci* 2006;28(1-2):77-85.
- Zhu R, Xia Z. Study on polymorphisms in metabolic enzyme genes, DNA repair genes and individual susceptibility to childhood leukemia. *Wei Sheng Yan Jiu* 2004;33(5):635-8.

9. ANEXOS

ANEXO I

QUESTIONÁRIO

Eu,....., pertencço à Comunidade Quilombola Rural Furnas da Boa Sorte, do Município de Corguinho-MS, Brasil, e por participar do Projeto de Pesquisa **“POLIMORFISMO GSTM1 E PROGINS EM MULHERES DE COMUNIDADES QUILOMBOLAS, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL”**, responderei as questões abaixo.

1. Idade:_____ Data de nascimento:___/___/___ Altura:_____ Peso:_____
2. Estado civil: () solteira () companheiro () separada/divorciada
fixo
() casada ()icante
- 2.a Você tem algum grau de parentesco com seu marido, companheiro, etc...
() sim () não
() Primo de 1º grau () Primo de 2º grau () Parente
3. Profissão: () do lar () rural () estudante () outros
4. Grau de instrução:
Ensino fundamental (1º grau) () completo () incompleto
Ensino médio (2º grau) () completo () incompleto
Curso técnico () sim () não Qual:_____
Curso superior () completo () incompleto Qual:_____
5. Renda familiar:
() 01 salário mínimo () 02 salários mínimos () 03 salários mínimos
() 04 ou mais salários mínimos
6. Você fuma? () sim () não
Quanto cigarros por dia?
() menos de 1 maço () 1 maço () 2 maços () 3 maços ou mais
Há quanto tempo?
() menos de 1 ano () 1 a 5 anos () mais de 5 anos
7. Faz uso de bebida alcoólica? () sim () não
Qual(is)? () cerveja () vinho () pinga () conhaque () outros
Quando? () diariamente () semanalmente () mensalmente
8. Você menstruou com quantos anos? _____anos
Quando ocorreu a última menstruação? _____
9. Você teve a 1ª relação sexual com quantos anos? _____anos
10. Nos últimos três meses, você teve quantos parceiros sexuais
() nenhum () 1 parceiro () 2 parceiros () 3 parceiros ou mais
11. Você já teve DST- Doenças Sexualmente Transmissíveis?
() sim () não qual(is):_____

12. Você conheceu os métodos contraceptivos, de que maneira?
() pela internet () pelo médico () pelo professor
() pelos amigos () pelos parentes () pela TV
() pela mãe () pelos pais () outros
13. O que é método anticoncepcional ou contraceptivo?
() não sei
() são métodos de diferentes tipos usados por homens e mulheres para evitar gravidez
() são estudos elaborados por médicos para não ocorrer gravidez
14. Quais destes métodos você já ouviu falar?
() DIU () camisinha masculina
() pílula anticoncepcional () camisinha feminina
() espermicida () pílula do dia seguinte
() coito interrompido () tabelinha
() injetável () vasectomia
() ligadura de trompas
() outros
Destes métodos, qual(is) já fez uso? _____
15. Usou método contraceptivo desde a 1ª relação sexual?
() sim () não
Se **não**, depois de quanto tempo após a 1ª relação começou a usar?

16. Toma medidas seguras para evitar gravidez e doenças sexualmente transmissíveis (sexo seguro)?
() sim () não Como? _____
17. Quantas vezes você engravidou? _____
Parto normal – quantas vezes? _____
Cesárea - quantas vezes? _____
Aborto - quantas vezes? _____
18. Sua gravidez foi programada? () sim () não
19. Sua 1ª gravidez aconteceu com quantos anos? _____ anos
20. Após o parto, você amamentou por:
() 3 meses () 6 meses () 1 ano () mais de uma ano
21. Você já teve Câncer? () sim () não qual(is) _____
22. Você tem história de câncer na família? () sim () não
qual(is) _____
23. Você já participou de campanha ou de programa de prevenção de câncer?
() sim () não qual(is) _____
24. Você sabe fazer auto-exame da mama? () sim () não
25. Qual o melhor período para fazer auto-exame da mama?
() próximo da menstruação
() após a menstruação

26. Preventivo (Exame Papanicolaou)

Com quantos anos você fez o primeiro preventivo? _____anos

Você fez preventivo: ☐ este mês ☐ este ano
 ☐ no ano passado ☐ há 3 anos atrás

Qual a importância do preventivo? _____

É portadora de alguma doença? ☐ sim ☐ não qual(is)_____

ANEXO II



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar da pesquisa "Câncer feminino: rastreamento e detecção precoce de câncer de mama e de colo do útero na Comunidade Quilombola Rural Fumas do Dionízio e Fumas da Boa Sorte, do Estado de Mato Grosso do Sul". Você foi selecionada numa população de mulheres e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com o programa. No entanto a sua participação será benéfica no sentido de permitir tomadas de medidas que previnem e/ou tratam a doença.

O objetivo deste estudo é realizar rastreamento e detecção precoce de câncer de mama e de colo de útero em comunidades negras, fechadas, localizadas em região de difícil acesso, visando contribuir com dados e ações que possam prevenir essas doenças, reduzindo a mortalidade. Será realizado inquérito através de questionários fechados, de exame clínico geral e das mamas (mamografia) e da coleta de material para o exame preventivo do câncer do colo do útero (exame de Papanicolaou), em mulheres negras das comunidades em estudo, de faixa etária priorizada. Também será realizado levantamento, através de aplicação de questionários, quanto à adesão aos métodos contraceptivos pelas mulheres negras selecionadas.

As amostras serão mantidas anônimas, com risco de perda de privacidade quando novas informações geradas possam beneficiar diretamente ao próprio paciente.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder um questionário devidamente testado e comparecer em local e data determinados para realização de exame médico (clínico/mamografia) e coleta de material para análises de laboratório (secreção vaginal/Papanicolaou e sangue). Os materiais biológicos serão descartados, após serem utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no projeto.

Todo e qualquer outro uso dos materiais biológicos coletados deverá ser objeto de estudo de um novo projeto de pesquisa que deverá ser submetido à apreciação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Valdir Shigueiro Siroma – responsável pela pesquisa

Av. Afonso Pena, 1447 – Campo Grande-MS – Fone: 67 3324 1922

Declaro que entendi o objetivo, risco e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar,

Sujeito da pesquisa

ANEXO III



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1018 do Pesquisador Valdir Shigueiro Siroma intitulado "Câncer feminino: rastreamento e detecção precoce de câncer de mama e de colo do útero na Comunidade Quilombola Rural Furnas do Dionízio e Furnas da Boa Sorte, do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 20 de dezembro de 2007, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Odair Pimentel Martins

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 20 de dezembro de 2007.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

ANEXO IV

Cover Letter



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



December, the 12th, 2010.

Editor-in-Chief of
The Clinical & Experimental Obstetrics & Gynecology

Please find the attached our paper, entitled "***Prevalence of GSTM1 and PROGINS polymorphisms in an African-Decedent Population in Brazil***" for publishing consideration.

As per the *Instructions to Authors* of the *Clinical & Experimental Obstetrics & Gynecology*, we declare that:

- Our study was accomplished at the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, in collaboration with the Molecular Gynecology Laboratory (Gynecology Department) at the Federal University of São Paulo (UNIFESP), in São Paulo State, Brazil.
- The study protocol was approved by the Institutional Review Board of our Institutions and consent term for studies involving human beings was obtained.
- In the event that this manuscript is accepted for publication, we provide Springer Science and Business Media with the copyrights of the study, recognizing that any total or partial reproduction of this material without necessary authorization from Springer Science and Business Media is a violation of copyright.
- This work was financially supported by grants from the Post-Graduate Program on Health and Development in the West-Center Brazilian Region from the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), and all investigators are aware of and agree to the content of the manuscript and their being listed as co-authors on the manuscript.
- In addition, we would like to stress that there are no financial or other interests with regard to the submitted manuscript that might be construed as a conflict of interest.

We thank you in advance for the time and effort in consideration of this work.

Sincerely,

Valdir Shigueiro Siroma, M.D.
Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS)
Phone: +55-67-3378-3500; Fax: +55-67-3378-3500
E-mail: siromas@uol.com.br

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Cidade Universitária - CEP: 79070-900 – Campo Grande – Mato Grosso do Sul

ANEXO V

Prevalence of GSTM1 and PROGINs polymorphisms in African-Descendent Women in Brazil

Authors:

Valdir Shigueiro Siroma M.D.; Thais Siroma; Vanessa Espírito Gomes; Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva M.D., Ph.D.; Ricardo Dutra Aydos M.D., Ph.D.

Citation:

Siroma VS¹, Siroma T¹, Gomes VE¹, Silva ID², Aydos RD².

Affiliation:

¹Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, Brazil;

²Molecular Gynecology Laboratory, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil.

To whom correspondence should be address to:

Valdir Shigueiro Siroma, M.D.

Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS)

Phone: +55-67-3378-3500; Fax: +55-67-3378-3500

E-mail: siromas@uol.com.br

Prevalence of GSTM1 and PROGINS polymorphisms in African-Descendent Women in Brazil

ABSTRACT

Objectives: To determine genotype frequencies of progesterone receptor (PROGINS), Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms in African descendent women from Quilombola communities in Mato Grosso do Sul State.

Methods: A total of 101 African descendent women from Quilombola communities of *Furnas da Boa Sorte*, of *Furnas do Dionísio* and of *São Benedito* communities included in the local Health Assistance Program for Indian and African descendent Populations – PASNI-MS in Mato Grosso do Sul State (Brazil). The DNA was extracted from peripheral blood samples and genotyping for PROGINS and GSTM1 polymorphisms was performed by PCR and analyzed with agarose gel electrophoresis. **Results:** Frequencies of PROGINS polymorphism were: P1/P1 (wild type): 0.94 (94%), P1/P2 (heterozygote): 0.06 (6%), and P2/P2 (mutated homozygote): 0. The GSTM1 genotype frequencies were: positive genotype (1/1): 0.98 (98%), and null genotype (0/0): 0.02 (2%). No correlations with the age of menarch, pregnancy rates, body mass index (BMI), and family history of cancer were found. **Conclusions:** We concluded that PROGINS and GSTM1 polymorphisms, related with the action and metabolization of sex steroids, have low frequency in that population and were not associated with the development of pathological conditions such as cancer.

Introduction

Molecular and biochemical aspects of the cellular resistance process have been described, where the genes of the glutathione S-transferase (GST) family have been shown to play an important role (Hayes and Pulford, 1995; O'Brien and Tew, 1996; Burg and Mulder, 2002; L'Ecuyer et al., 2004). These mechanisms of cellular resistance include metabolic detoxification by the GST family (Schisselbauer et al., 1990; Tew, 1994). The GSTP1, GSTM1 and GSTT1 genes, which belong to the GST family, encode the most important phase II detoxifying proteins involved in the conjugation of substrates that are toxic to cancer cells, including chemotherapeutic agents used in breast cancer treatment such as anthracyclines (Arrick & Nathan, 1984).

Another polymorphism is PROGINS in the progesterone receptor. Several studies have suggested that the variant increases susceptibility to endometriosis (Wieser, 2002), (Lattuada, 2004) and (de Carvalho, 2007). A large pooled analysis of ovarian cancer risk and PROGINS showed no overall association but an increased risk associated with the endometrioid subtype.

Brazil is a diverse country of 8.5 million square km and of about 200 million people divided into 58.5% white origin, 9.3% of black/African origin, 30.8% of mixed-race origin, and 0.9% of Indian origin. Approximately 81.2% of the population live in urban areas. In the present work we aimed to determine frequencies of GSTM1 and PROGINS polymorphisms in African descendant women from three communities in the State of Mato Grosso do Sul (*Furnas do Dionísio, Furnas da Boa Sorte and São Benedito* communities) because of the lack of genetic information in this population and to analyze possible correlation with pathological conditions and/or history of cancer in their families.

Casuistic and Methods

Study population

A total of 101 African descendent women from Quilombola communities of *Furnas da Boa Sorte*, of *Furnas do Dionísio* and of *São Benedito* communities included in the local Health Assistance Program for Indian and African descendent Populations – PASNI-MS in Mato Grosso do Sul State (Brazil). The DNA was extracted from peripheral blood samples and genotyping for PROGINS and GSTM1 polymorphisms was performed by PCR and analyzed with agarose gel electrophoresis (de Carvalho, 2007).

Genotyping

Polymerase chain reaction (PCR) fragments were generated using the following primers: GSTM1 forward (F): 5' -GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C - 3' and GSTM1 reverse (R): 5' - GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G - 3; CYP17 F: 5' - CAT TCG CAC TCT GGA GTC - 3' and CYP17 R: 5' - AGG CTC TTG GGG TAC TTG - 3; PROGINS F: 5' - GGC AGA AAG CAA AAT AAA AAG A - 3' and PROGINS R: 5' - AAA GTA TTT TCT TGC TAA ATG TC - 3'. PCR was carried out using standard procedures. Briefly 20-μL aliquots containing approximately 70 ng Genomic DNA, 25 pmols primer, 1X reaction buffer, 100 μM dNTPs and one unit of Taq polymerase. The reaction was performed for 35 cycles at 55°C annealing temperature to all primer sets. After PCR amplification, the polymorphisms were assayed by restriction fragment length polymorphism. The

CYP17 PCR product was incubated with 3 units of specific restriction enzyme Msp A1I (MBI Fermentas) at 37°C for 3 h. The resulting fragments were electrophoresed

on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV. We used only PCR to genotype subjects for GSTM1 and PROGINs. Homozygous deletion variants of GSTM1 did not result in an amplification fragment. On the other hand, the presence of the gene resulted in a 268-bp amplicon. The wild-type allele for PROGINs, defined as the absence of insertion, generated a 149-bp fragment and its polymorphic allele generated a 455-bp fragment. Alleles were classified on the basis of the presence of amplified fragments of corresponding size using standard markers.

Results

One hundred and one women from an Afro-Descendant Community from Furnas da Boa Sorte (in Mato Grosso do Sul State – West-Center Brazil) were studied. They presented mean age of 32.8 years, mean body mass index of 26.02 kg/m², with mean age of menarche 12.5 years, 48% of women were married, 52% were single or widower, mean of parturition of 2.1, mean time of breastfeeding 6.5 months. In relation to habits, 64% of women were taking oral contraceptives, 13% of them were smokers, 35% used to drink alcohol socially. Thirty three percent of women had some degree of kinship with their husbands and 7% of them had history of cancer in the family.

GSTM1 Polymorphism

When the GSTM1 polymorphism was analyzed among studied women we observed predominant frequency of the wild genotype (the positive genotype) in relation to the null genotype.

Table 1 – Genotype frequencies of GSTM1 polymorphism.

Polymorphism	Genotype	N	Frequencies
GSTM1	1/1	98	0.98
	0/0	2	0.02
Total		101	100

PROGINS Polymorphism

The genotype distribution of PROGINS polymorphism is found in table 2. We also found predominant frequency of (P1/P1) wildtype genotype in relation to the heterozygote (P1/P2). None of the samples presented the (P2/P2) mutated genotype.

Table 2 – Genotype frequencies of PROGINS polymorphism

Polymorphism	Genotype	N	Frequencies
PROGINS	P1/P1	94	0.98
	P1/P2	6	0.06
	P2/P2	0	0
Total		101	100

Table 3 – Frequencies of PROGINS polymorphism in cases according to history of cancer in the family.

Polymorphisms	Genotypes	Groups			
		With history of cancer*		Without history of cancer	
		n	%	n	%
PROGINS	P1/P1	24	49,0	25	51.0
	P1/P2	18	81,8	4	18.2
	Total	42	100,00	29	100.00

(*): History of cancer in the family.

The same analysis was done with GSTM1 but none of cases with history of cancer in the family presented the positive genotype.

Other variables

We also investigated possible association between the studied polymorphisms and BMI, age of menarch, number of pregnancies and history of cancer in the family. No positive correlations were found.

Discussion

In the present study we aimed to analyze the prevalence of PROGINS and GSTM1 polymorphisms and verify possible correlation between these polymorphisms and morbidity in African descendant women in Brazil.

The studied genes related to metabolization and action of sex hormones does not seem to have influence on the development of pathological conditions such as cancer in the studied population.

We found no significant association between PROGINS and GSTM1 frequencies and history of cancer in this population.

No correlations were found between the studied genes and variables such body mass index (BMI), age of menarch, number of pregnancies and history of cancer.

In relation to ethnics, the classification in Brazil is very difficult due to intense mixture of races (Gonçalves, 2010). Our work was pioneer to look at the genetic background of African descendant populations, called Quilombolas, descendants of African slaves that came to Brazil more than 400 hundred years ago. These population seem to have fewer rates of cancer incidence comparing to general Brazilian population. In Campo Grande (a West-Center State of Brazil), they live in very closed isolated small communities called Furnas (with very difficult access), with nonrandom mating. They practice rudimentary agriculture without insecticides and pesticides.

In relation to estrogen dependent gynecological diseases, our group found significant association between the prevalence of PROGINS and GSTM1 with endometriosis, uterine fibroids and endometrial carcinoma (de Carvalho, 2007; Gomes, 2007; Junqueira, 2008).

The presence of PROGINS polymorphism alters the progesterone receptor function which in turn is responsible for cellular disturbances leading to the development of benign and malign gynecological diseases. Unfortunately uor study could not detect any association between PROGINS polymorphism and clinical and epidemiological characteristics of the studied population.

References

1. Hayes JD and Pulford DJ (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600.
2. O'Brien ML and Tew KD (1996). Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur. J. Cancer* 32: 967-978.

3. Burg D and Mulder GJ (2002). Glutathione conjugates and their synthetic derivatives as inhibitors of glutathione-dependent enzymes involved in cancer and drug resistance. *Drug Metab. Rev.* 34: 821-863.
4. L'Ecuyer T, Allebban Z, Thomas R and Vander Heide R (2004). Glutathione S-transferase overexpression protects against anthracycline-induced H9C2 cell death. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: H2057-2064.
5. Schisselbauer JC, Silber R, Papadopoulos E, Abrams K, et al. (1990). Characterization of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Res.* 50: 3562-3568.
6. Tew KD (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 54: 4313-4320.
7. Arrick BA and Nathan CF (1984). Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res.* 44: 4224-4232.
8. Wieser F, Schneeberger C, Tong D, Tempfer C, Huber JC and Wenzl R. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis, *Fertil Steril* 77 (2002), pp. 309–312.
9. Lattuada D, Somigliana E, Vigano P, Candiani M, Pardi G and Di Blasio A.M. Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS?, *Clin Endocrinol (Oxf)* 61 (2004), pp. 190–194.
10. De Carvalho CV, Nogueira-De-Souza NC, Costa AM, Baracat EC, Girao MJ and D'Amora P et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17alpha (CYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk, *Gynecol Endocrinol* 23 (2007), pp. 29–33. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (8)
11. Gonçalves VF, Parra FC, Gonçalves-Dornelas H, Rodrigues-Carvalho C, Silva HP, Pena SDj. Recovering mitochondrial DNA lineages of extinct Amerindian nations in extant homopatric Brazilian populations. *Investig Genet.* 2010 Dec 1;1(1):13.
12. Gomes MT, Castro Rde A, Villanova FE, da Silva ID, Baracat EC, de Lima GR, Girão MJ. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGINS, may be a factor related to the development of uterine fibroids. *Fertil Steril.* 2007 May;87(5):1116-21.
13. Junqueira MG, da Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Carvalho CV, Leite DB, Gomes MT, Baracat EC, Lopes LA, Nicolau SM, Gonçalves WJ. Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of endometrial cancer development. *Int J Gynecol Cancer.* 2007.

ANEXO VI

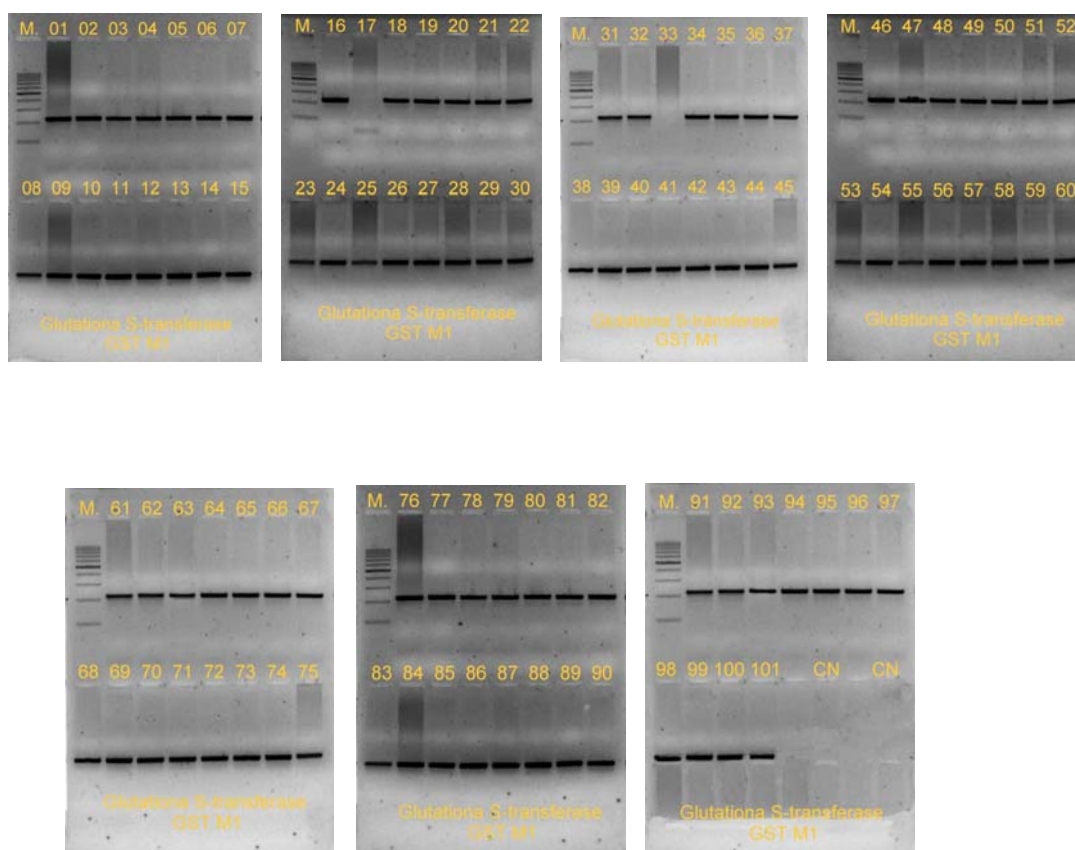


Figura 7 – Fotos do Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando polimorfismos do gene da GSTM1 em mulheres de comunidades quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. M: marcador de peso molecular de 100pb.

ANEXO VII

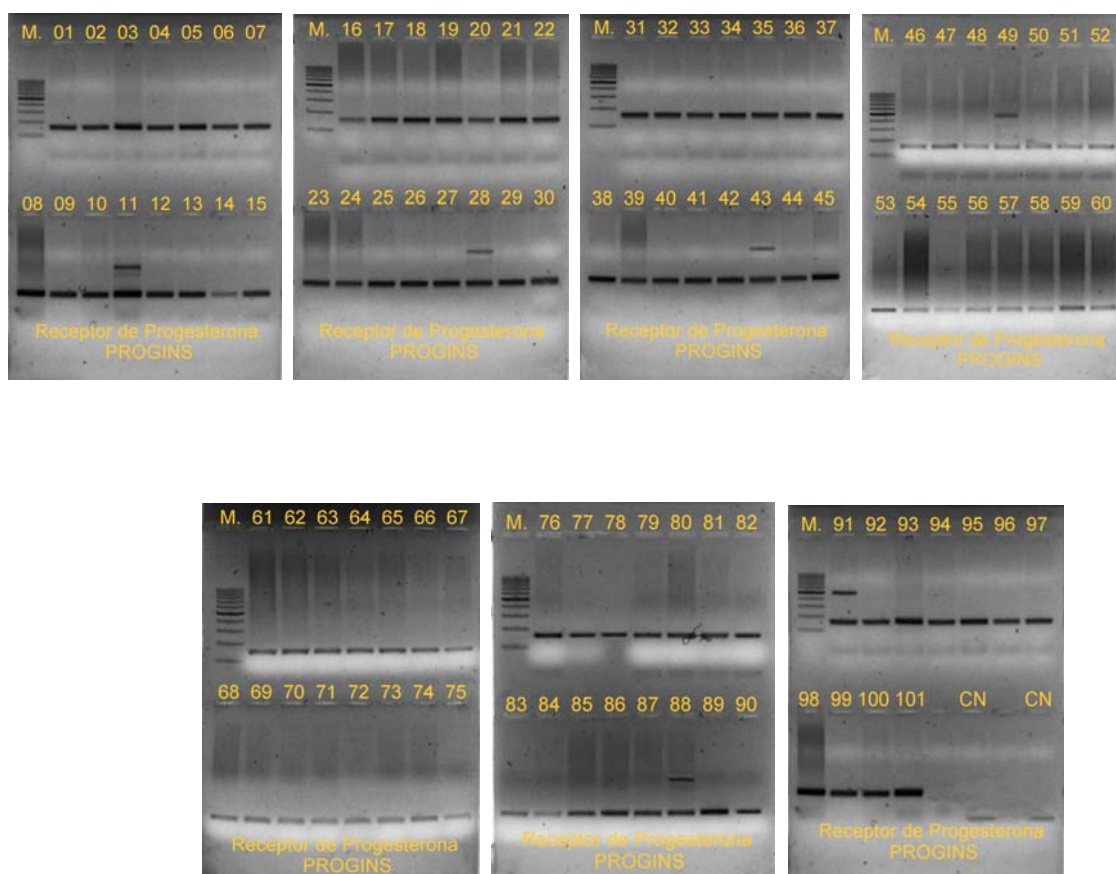


Figura 8 - Fotos do Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando polimorfismos do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres de comunidades quilombolas do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. M: marcador de peso molecular de 100pb.

ABSTRACT

Objectives: To estimate genotype frequencies of progesterone receptor (PROGINS), Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms in African descendent women from Quilombola communities in Mato Grosso do Sul State and to verify some associated factors. **Methods:** A total of 101 African descendent women from Quilombola communities of *Furnas da Boa Sorte*, of *Furnas do Dionísio* and of *São Benedito community* included in the local Health Assistance Program for Indian and African descendent Populations – PASNI-MS in Mato Grosso do Sul State (Brazil). The DNA was extracted from peripheral blood samples and genotyping for PROGINS and GSTM1 polymorphisms was performed by PCR and analyzed with agarose gel electrophoresis. For classification of mammography and breast density category were taken as basis the standards of the system ACR-BIRADS, 1998. **Results:** Frequencies of PROGINS polymorphism were: P1/P1 (wild type), 94%; P1/P2 (heterozygote), 6%; and P2/P2 (mutated homozygote), 0%. The GSTM1 genotype frequencies were: positive genotype (1/1), 98% and null genotype (0/0), 2%. No correlations with the age of menarch, pregnancy rates, body mass index (BMI), and family history of cancer were found. There was no positive association ($p > 0.05$) among mammographic density, system ACR-BIRADS and epidemiological variables studied, except for age who had a higher mean ($p \leq 0.05$) for women with mammographic D2. **Conclusions:** We concluded that PROGINS and GSTM1 polymorphisms, involved in the action and metabolism of sex steroids, have low frequency in that population and were not associated with the development of pathological conditions such as breast cancer and are not related with the epidemiological data analysis.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Bueno S. Minidicionário da Língua Portuguesa. Ed. Rev. E Atual. FTD. São Paulo; 2000.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estruturas e referências. 2ª ed. São Paulo; 2005.